

Aus dem Institut für Immunologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Dietrich Kabelitz)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**EVALUATION DES STELLENWERTES DER SAUREN SPHINGOMYELINASE
IN DER DIAGNOSTIK DER SEPSIS**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
MAIKE REINICKE
aus Husum

Kiel 2009

-
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Schütze, Institut für Immunologie
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Norbert Weiler, Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin

Tag der mündlichen Prüfung: 2. August 2010

Zum Druck genehmigt, Kiel den 2. August 2010

gez. Maike Reinicke

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Definition der Sepsis.....	1
1.2 Pathophysiologie der Sepsis	4
1.3 Diagnose der Sepsis.....	5
1.3.1 C-reaktives Protein	6
1.3.2 Procalcitonin (PCT).....	7
1.4 Saure Sphingomyelinase (A-SMase).....	8
1.5 Ziel der Studie	11
2. Material und Methoden.....	12
2.1 Klinischer Teil	12
2.1.1 Studiendesign.....	12
2.1.2 Patienten der prospektiven Beobachtungsstudie.....	13
2.1.3 Patienten der retrospektiven Studie.....	15
2.1.4 Kontrollgruppe	16
2.2 Experimenteller Teil	17
2.2.1 Probengewinnung.....	17
2.2.2 Auswertung der Blutproben	17
2.2.2.1 Chemikalien und Lösungen	17
2.2.2.2 Aktivitätsbestimmungen der sauren Sphingomyelinase.....	19
2.2.2.3 PCT-Bestimmung	23
2.2.2.4 CRP-Messung	24
2.2.3 Statistik	24
3. Ergebnisse	25
3.1 Postoperative Phase (prospektive Beobachtungsstudie).....	25
3.1.1 Einfluss der Tumorerkrankung auf die A-SMase-Aktivität.....	25
3.1.2 Einfluss der Operationsart auf die A-SMase-Aktivität und das PCT	26

3.1.3 A-SMase-Aktivität, CRP und PCT im postoperativen Verlauf	27
3.2 Einfluss der Sepsis auf die A-SMase-Aktivität und das PCT	32
3.2.1 Prospektiv und retrospektive Studie (Statistik): nicht septische versus septische Patienten.....	32
3.2.2 Prospektive Studie (Kasuistik): Einfluss der Sepsis auf die A-SMase-Aktivität und das PCT	36
3.2.3 Retrospektive Studie (Kasuistik): Einfluss der Sepsis auf die A-SMase-Aktivität und das PCT	39
4. Diskussion	46
4.1 Tumorerkrankung und die Aktivität der A-SMase	47
4.2 PCT-Spiegel und A-SMase-Aktivität als prognostischer Marker der Sepsis	48
4.3 Kinetik der PCT-Spiegel und der A-SMase-Aktivitäten während der Sepsis	50
5. Zusammenfassung und Ausblick	55
6. Literaturverzeichnis.....	57
7. Danksagung	66

1. Einleitung

Die Entstehung von infektiösen Komplikationen nach Operationen - wie z.B. abdominal-chirurgischen Eingriffen - mit der Gefahr der Entwicklung einer konsekutiven Sepsis stellt nach wie vor eines der zentralen Probleme auf Intensivstationen dar. Nicht selten kommt es durch einen lokalen infektiösen Stimulus zu einer frühen körpereigenen systemischen Antwortreaktion, dem sog. systemic inflammatory response syndrome (SIRS), die in ihrem Verlauf zu einer manifesten Sepsis führen kann.

Nach neuesten Angaben des Kompetenznetzwerkes Sepsis (SepNet) werden allein in Deutschland jährlich 79 000 Einwohner (116 von 100 000 Einwohnern) auf Grund einer Sepsis auf Intensivstationen behandelt (Engel et al. 2007). Septische Erkrankungen sind die dritthäufigste Todesursache nach dem akuten Myokardinfarkt. Direkte anteilige Kosten, die allein für die intensivmedizinische Behandlung von Patienten mit septischem Krankheitsverlauf anfallen, betragen ca. 1,77 Milliarden Euro.

Die frühzeitige und sichere Diagnose einer Sepsis in ihren unterschiedlichen Schweregraden ist demnach essentiell, um der hohen Mortalität und Morbidität dieser Erkrankung zu begegnen und spezifische Therapiemaßnahmen möglichst früh einzuleiten.

1.1 Definition der Sepsis

Sepsis ist eine komplexe, systemische und inflammatorische Wirtsreaktion auf eine Infektion. Es gibt derzeit keinen Parameter, der allein zur Diagnose der Sepsis führen kann.

Eine Bakteriämie bezeichnet das Vorkommen lebensfähiger Bakterien im Blut; während das sog. SIRS eine generalisierte, hyperinflammatorische Reaktion verschiedener Ursachen wie z.B. Infektion, Verbrennung oder Trauma reflektiert. Wird ein SIRS durch eine Infektion hervorgerufen, spricht man von Sepsis. Eine schwere Sepsis liegt dann vor, wenn zusätzlich wenigstens eine Organdysfunktion vorliegt. Der Begriff des septischen Schocks beinhaltet eine Sepsis mit dem klinischen Bild eines Schocks. Somit definieren die Begriffe Sepsis, schwere

Sepsis und septischer Schock keine einzelnen Formen der Sepsis, sondern bilden vielmehr ein Krankheitskontinuum das sich als eine Kombination aus Vitalparametern, Laborwerten, hämodynamischen Daten und Organfunktionen darstellt. Eine Bakteriämie findet sich in Abhängigkeit von einer antibiotischen Vorbehandlung nur bei durchschnittlich 30% der Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock (Bates et al. 1990, Leibovici et al. 1991, Bates et al. 1997, Crowe et al. 1998, Martin et al. 2000). In weiteren ca. 30% der Patienten kann kein mikrobiologisch gesicherter Infektionsnachweis geführt werden, obwohl eine Infektion nach klinischen Kriterien wahrscheinlich ist (Vincent et al. 1995, Alberti et al. 2002). Die Interpretation mikrobiologischer Befunde ist bei kritisch kranken Patienten problematisch, da oft Mikroorganismen nachgewiesen werden, die lediglich einer Kolonisation entsprechen können. Kritisch kranke Patienten weisen häufig ein SIRS und multiple Organdysfunktionen auf.

Der kausale Zusammenhang mit einer Infektion ist daher oft nicht sicher nachzuweisen. Unter Verwendung der sog. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM) Konsensus-Konferenz-Kriterien (1992) (Tabelle 1) als Einschlusskriterium für klinische Studien zur Diagnose und Therapie der schweren Sepsis und des septischen Schocks wurden konsistent hohe Letalitätsraten von ca. 40% - 60% beobachtet. Diese Kriterien weichen erheblich von den Kriterien des Centers of Disease Control (CDC) (Garner et al. 1996) und den Kodierungen der International Classification of Diseases (ICD) ab. Trotz der geringen Spezifität der Kriterien werden diese weiter als Arbeitswerkzeug für die Diagnose der schweren Sepsis und des septischen Schocks von der Deutschen-Sepsis-Gesellschaft zur Verwendung empfohlen.

Tabelle 1: Diagnosekriterien für Sepsis und septischen Schock entsprechend den ACCP/SCCM Konsensus-Konferenz Kriterien (1992)

<p>I Nachweis der Infektion</p> <p>Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinisch Kriterien</p>
<p>II Severe inflammatory host response (SIRS) (mind. 2 Kriterien)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fieber ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^{\circ}\text{C}$) bestätigt durch eine rektale oder intravasale oder vesikale Messung • Tachykardie: Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$ • Tachypnoe (Frequenz $\geq 20/\text{min}$) oder Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 \leq 4,3 \text{ kPa} / \leq 33 \text{ mmHg}$) Leukozytose ($\geq 1200/\text{mm}^3$) oder Leukozytopenie ($\leq 4000/\text{mm}^3$) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblut
<p>III Akute Organdysfunktion (mind. 1. Kriterium)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium • Relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten um mehr als 30% innerhalb von mehr als 24 Stunden oder Thrombozytenzahl $\leq 100.000/\text{mm}^3$. Eine Thrombozytopenie durch eine akute Blutung oder immunologischer Ursachen muss ausgeschlossen werden • Arterielle Hypoxämie: $\text{PaO}_2 \leq 10 \text{ kPa}$ (70 mmHg) unter Raumluft oder ein $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$-Verhältnis von $\leq 33 \text{ kPa}$ ($\leq 75 \text{ mmHg}$) unter Sauerstoffapplikation. Eine manifeste Herz- und Lungenerkrankung muss als Ursache ausgeschlossen sein. • Renale Dysfunktion: Eine Diurese von $\leq 0,5 \text{ ml/kg/h}$ für wenigstens 2 Stunden trotz ausreichender Volumensubstitution und / oder ein Anstieg des Serumkreatinin $> 2\text{x}$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches • Metabolische Azidose: Base Excess $\leq -5 \text{ mmol/l}$ oder eine Laktatkonzentration $> 1,5$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches
<p>Sepsis: Kriterien I und II</p> <p>Schwere Sepsis: Kriterium I, II und III</p> <p>Septischer Schock: Kriterium I und II sowie für wenigstens eine Stunde ein systolischer arterieller Blutdruck $\leq 90 \text{ mmHg}$ bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck $\leq 65 \text{ mmHg}$ oder notwendiger Vasopressoreinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck $\geq 90 \text{ mmHg}$ oder den mittleren arteriellen Mitteldruck $\geq 65 \text{ mmHg}$ zu halten. Die Hypotension besteht trotz adäquater Volumengabe und ist nicht durch andere Ursachen zu erklären.</p>

1.2 Pathophysiologie der Sepsis

In der Genese dieser Erkrankung spielt das Zusammenwirken von Infektion und Immunantwort eine entscheidende Rolle. Dabei ist es unerheblich, ob diese Infektion bakterieller, viraler, fungaler oder parasitärer Ursache ist. Alle Erreger sind prinzipiell in der Lage, eine Sepsis auszulösen. Letztlich kommt es zu einer Aktivierung immunkompetenter Zellen und zur Ausschüttung der primären Inflammediatoren Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α) sowie Interleukin-1 (IL-1). Diese primäre Immunantwort wird durch das Freisetzen einer Vielzahl von sekundären Mediatoren weiter verstärkt (Cohen, 2002). Allerdings kommt es neben der Hyperinflammation auch zu einer antiinflammatorischen Reaktion. Dies geschieht durch die Bildung antiinflammatorischer Substanzen (z.B. lösliche TNF α -Rezeptoren, IL-1 Rezeptorantagonisten, IL-4, IL-10) sowie durch programmierten Zelltod (Apoptose) immunkompetenter Zellen. Welche Auswirkungen das Zusammenspiel pro- und antiinflammatorischer Mechanismen auf den klinischen Verlauf hat, ist zurzeit noch ungeklärt.

Die Immunantwort bei Sepsis führt zu einer Beeinträchtigung einer Reihe von Körperfunktionen. Es kommt zu einer Expression von „tissue factor“ auf Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen. Dies führt zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems. Gleichzeitig werden physiologische Antikoagulantien (Antithrombin III, Protein C/Protein S-System, „tissue factor pathway inhibitor“) in ihrer Wirkung gehemmt. Es resultiert eine disseminierte intravasale Gerinnung (ten Cate et al. 2001). Endothelzellen exprimieren Adhäsionsmoleküle für Leukozyten. Durch den Kontakt mit der Endothelzelloberfläche werden die Leukozyten aktiviert, was zur Freisetzung zytotoxischer Substanzen ("respiratory burst") führt. Diese wirken nicht nur antimikrobiell, sondern schädigen auch Endothelzellen. Endothelzellschäden bewirken Störungen der Mikrozirkulation sowie die Ausbildung eines Kapillarlecks, das den Austritt intravasaler Flüssigkeit in das Interstitium erlaubt. Massive Flüssigkeitsverschiebungen können zu einem ausgeprägten intravasalen Volumenmangel führen (Hotchkiss und Karl 2003). Inflammediatoren stimulieren die endotheliale NO-Synthetase. NO (Stickoxid) ist eine Substanz mit ausgeprägten vasodilatatorischen Eigenschaften. Die hierdurch vermittelte arterielle Hypotension ist eine charakteristische Eigenschaft des septischen Schocks. Die Vasodilatation verringert die kardiale Vorlast durch einen

fehlenden venösen Rückstrom noch zusätzlich zu dem Flüssigkeitsverlust über das Kapillarleck (Landry und Oliver 2001).

Sepsis geht mit einer Kardiomyopathie einher, die sich in einer reduzierten Ejektionsfraktion und diastolischen Dilatation des linken Ventrikels manifestiert. Die Erhöhung des linksventrikulären enddiastolischen Volumens erlaubt jedoch in der Regel die Aufrechterhaltung eines suffizienten Schlagvolumens. Gegenwärtige Daten machen eine ausgeprägte endokrine Dysfunktion in der Sepsis wahrscheinlich (Ruggiero 2008, Salgado et al. 2008). Dies beinhaltet z.B. eine relative Nebennierenrindeninsuffizienz sowie eine inadäquate Vasopressin- und Insulinsekretion. Die Bedeutung dieser Pathomechanismen für den klinischen Verlauf ist noch Gegenstand der Forschung. Die ausgeprägten kardiozirkulatorischen Störungen, die auch die Organperfusion und Mikrozirkulation betreffen, begünstigen die Entstehung eines Multiorganfunktionssyndroms, das die häufigste Todesursache in diesem Patientenkollektiv darstellt (Riedemann et al. 2003).

1.3 Diagnose der Sepsis

Da die Mortalität der Patienten mit Sepsis mit dem Ausmaß der inflammatorischen Wirtsantwort ansteigt, sind Marker von Bedeutung, die Patienten mit Infektionen und drohendem Organversagen, d.h. einer beginnenden Sepsis zeitnah diskriminieren, um effiziente Therapiemaßnahmen frühzeitig einzuleiten (Dellinger et al. 2004). Momentan steht kein alleiniger Parameter, der zur Diagnose der Sepsis führt, zur Verfügung, da die Sepsis, schwere Sepsis und der septische Schock sich als komplexe und multifaktorielle Krankheitsbilder darstellen (Reinhart et al. 2005).

Die systemische Freisetzung von Zytokinen (Interleukin-6 oder Tumornekrosefaktor-alpha) ist die erste nachweisbare Reaktion des Organismus bei inflammatorischen Reaktionen (Oberhoffer et al. 1999). Trotz ihrer herausragenden Rolle im Rahmen einer Sepsis, sind diese Botenstoffe aufgrund der kurzen biologischen Halbwertszeit als klinische Marker nur begrenzt von Bedeutung.

1.3.1 C-reaktives Protein

Das Kapsel-reaktive Protein (CRP) ist ein fünfeckförmiges kohlenhydratfreies Protein, das in der Leber gebildet wird. Es gehört einer bestimmten Eiweißgruppe, den sog. Akut-Phase-Proteinen an, deren Blutkonzentration im Rahmen entzündlicher (infektiöser und nicht-infektiöser) Erkrankungen ansteigen. Den stärksten Stimulus bilden dabei jedoch bakterielle Infektionen. CRP kann zur Unterscheidung von viralen und bakteriellen Infektionen - sofern letztere nicht allzu lokalisiert auftreten - herangezogen werden, da virale Infekte zu keinem oder nur geringerem CRP-Anstieg führen.

CRP ist Teil des Immunsystems, ein sog. Opsonin, welches das Komplementsystem aktivieren kann. Die CRP - Produktion in der Leber wird am stärksten durch Interleukin 6 (IL-6) angeregt. Es bindet an Phosphocholin und erkennt so Bakterien und Phospholipid-Bestandteile zerstörter körpereigener Zellen. Das gebundene CRP aktiviert das Komplement-System, bindet an Makrophagen und setzt so humorale und zelluläre Effektormechanismen des spezifischen Immunsystems in Gang. Dieser unspezifische Abwehrmechanismus ist erheblich schneller als die Reaktion des spezifischen Immunsystems (Hoffmann et al. 1999).

CRP ist auch bei gesunden Menschen im Blut vorhanden. Als normal gelten bei Erwachsenen Werte bis 10 Milligramm pro Liter (mg/l) oder 1 Milligramm pro Deziliter (mg/dl). Zur Erfassung komplizierender Infektionen im postoperativen Verlauf ist das CRP nur bedingt geeignet, da die Zu- oder Abnahme einer Entzündungsreaktion durch ein Ansteigen oder Absinken des CRP lediglich mit einer Verzögerung von etwa 24 Stunden angezeigt wird (Silvestre et al. 2009). Das Ausmaß des CRP-Anstiegs kann jedoch einen Hinweis auf den Schweregrad einer der Erkrankungen geben:

- Werte zwischen 10 und 50 mg/l: leichte oder lokale (örtlich begrenzte) Entzündungen. (Rauchen führt ebenfalls zu leicht erhöhtem CRP)
- Werte über 50 mg/l: schwere Entzündungen
- Werte über 100 mg/l: Schwere Erkrankungen, bakterielle Infektionen, Sepsis, bakterielle Hirnhautentzündung oder Lungenentzündung, Pankreatitis, schwere Operationen, schwere rheumatische Erkrankungen im aktiven Stadium, aktiver Morbus Crohn, manche ausgedehnte Tumore, schwere akute Osteomyelitis

1.3.2 Procalcitonin (PCT)

Procalcitonin (PCT) ist eine Vorstufe des Hormons Calcitonin. Unter normalen Stoffwechselbedingungen wird das hormonell aktive Calcitonin in den C-Zellen der Schilddrüse durch spezifische intrazelluläre proteolytische Spaltung aus dem Prohormon PCT synthetisiert und sezerniert. Bei bakteriellen Infektionen wird jedoch intaktes PCT im Blut gefunden. Als Syntheseort bei bakterieller Infektion gelten alle Organe. Bereits nach zwei bis vier Stunden nach dem mikrobiologischen Stimulus ist das PCT im Blut nachweisbar. Damit ist es schneller detektierbar als beispielsweise das C-reaktive Protein, jedoch langsamer als die Zytokine (Luzzani et al. 2003). Neben relativ unspezifischen Parametern wie Leukozytenzahl und C-reaktivem Protein hat die Bestimmung der PCT-Plasmaspiegel in den vergangenen Jahren zu einem Fortschritt in der Erkennung und Verlaufsbeurteilung der Sepsis geführt (Reith et al. 1998; Müller et al. 2000). Vor Evidenzbasiertem Hintergrund ist das Procalcitonin derzeit der wegweisende Marker der Sepsis (Reinhart et al. 2005) und anderen Infektionen (Christ-Chain et al. 2005), wobei er im Kontext des gesamten Krankheitsbildes zu betrachten ist.

In diversen früheren Studien wurde gezeigt, dass eine Korrelation zwischen dem Anstieg der Sepsis und dem Schweregrad der Infektion besteht. Bei einer PCT-Plasmakonzentration von $< 0,5$ ng/ml gilt eine schwere Sepsis als ausgeschlossen. Werte über $> 1-2$ ng/ml bergen ein hohes Risiko einer Sepsis. Werte > 10 ng/ml sind mit einem deutlich erhöhten Risiko, an einer schweren Sepsis erkrankt zu sein, assoziiert (Brunkhorst et al. 2000, Müller et al. 2000, Harbarth et al. 2001, Rey et al. 2007). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass unter Einbeziehung des PCTs in die Sepsisdiagnostik die Spezifität und Sensitivität der Sepsisdiagnose zusätzlich erhöht werden kann (Harbarth et al. 2001). Außerdem steht das PCT nicht nur zur Diagnostik sondern auch zum Therapieverlauf zur Verfügung. Nobre et al. (2008) konnten in einer randomisierten Studie zeigen, dass mit Hilfe des PCT-Verlaufs die Dauer der Antibiotikatherapie während einer Sepsis bzw. eines septischen Schocks ohne bestehenden Nachteil reduziert werden konnte. Laut den S-2 Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft kann „Procalcitonin somit zum Ausschluss bzw. zur Sicherung der Diagnose beitragen“ und wird auf der Grundlage eines Evidenzgrades IIb als Grad C Empfehlung ausgegeben (Reinhart et al. 2006).

1.4 Saure Sphingomyelinase (A-SMase)

Neben der Aktivierung von Zytokinen wurde kürzlich in einem Tiermodell gezeigt, dass bioaktive Lipide wie die Ceramide eine entscheidende Rolle in der komplexen immunologischen Signalkaskade der Inflammation spielen - insbesondere als Mediator in der Entstehung eines septisch bedingten Lungenödems (Göggel et al. 2004). Die Ceramide vermitteln vielfältige Antworten auf Zellstress. Sie nehmen wichtige Funktionen in Form von Liganden oder von sog. second messengern in der Membran ein (Baumruker et al. 2001). Dieses kann zur Apoptose, Differenzierung, Inflammation, Zellzyklusarrest oder Proliferation der Zelle führen (Yusuf et al. 2008).

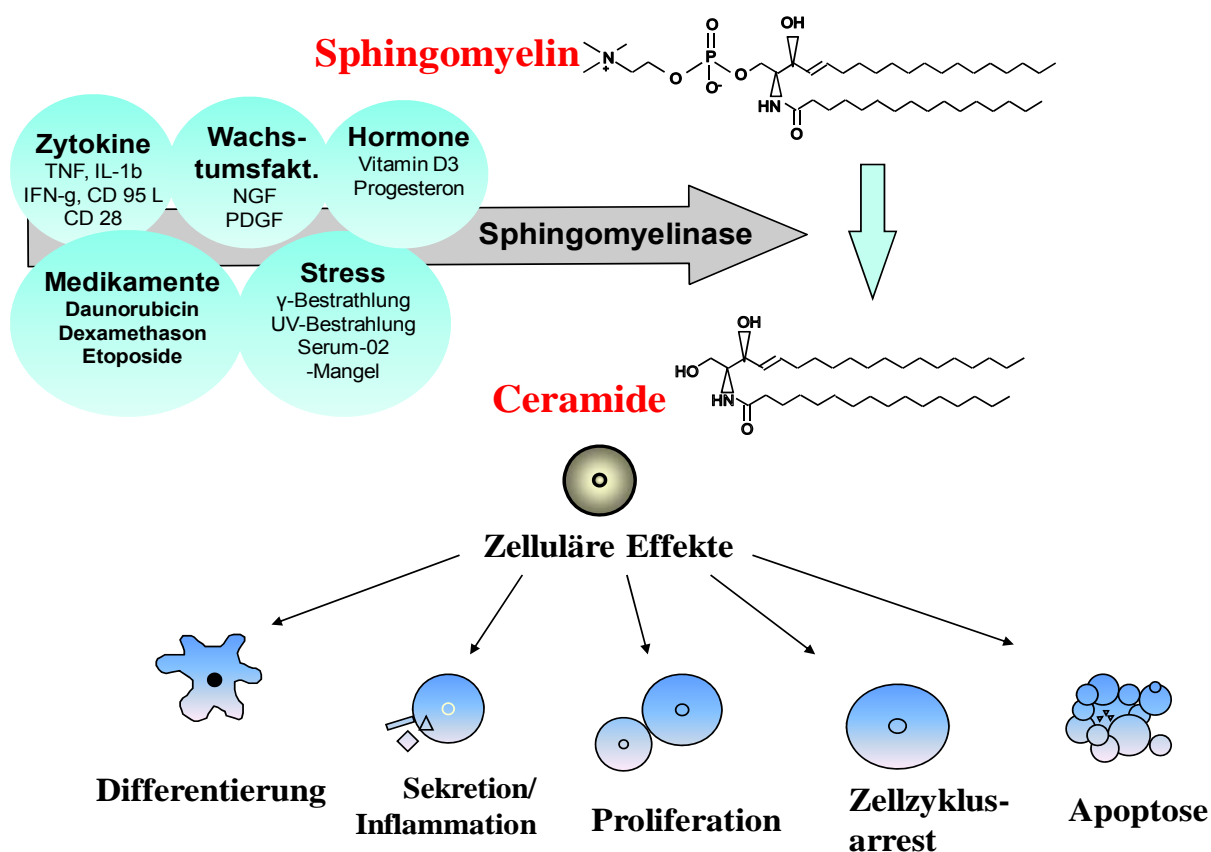


Abb.1: Sphingomyelinase katalysiert Sphingomyelin zu Ceramid stimuliert durch unterschiedliche Parameter

Bei den Ceramiden handelt es sich um Neutrallipide, die entweder durch eine Hydrolyse des Sphingomyelins oder durch eine de-novo-Synthese entstehen. Die Spaltung der Phosphodiesterbindung vom Sphingomyelin wird durch das Enzym

Sphingomyelinase (SMase) katalysiert. Derzeit werden verschiedene Formen anhand ihres pH-Optimums, ihrer Kofaktoren und der Lokalisation (intra- und extrazellulär) unterschieden. In dieser Arbeit wird die sekretorische saure SMase (A-SMase) im Plasma analysiert. Sie ist ein Produkt des sauren Sphingomyelinase - Gens und kommt sowohl extra- als auch intrazellulär vor. Isoliert wurde die A-SMase erstmals von Qintern et al. (1989 und 1987) aus humanem Urin von Patienten mit Peritonitis. Das Enzym gehört der Klasse der Zinkmetalloenzyme an, die für die optimale Aktivität Zink als Kofaktor benötigen (Schissel et al. 1998). Derzeit ist bekannt, dass die A-SMase sowohl von Makrophagen, Gefäßendothelzellen, Hautfibroblasten als auch Mikrogliazellen sezerniert wird (Tabas 1999).

Anfänglich wurde die A-SMase hauptsächlich im Rahmen der seltenen Niemann-Pick-Erkrankung erforscht. Die Ursache der autosomal-rezessiven, lysosomalen Speicherkrankheit liegt in einem genetischen Defekt der Sphingomyelinase (Brady et al. 1966). Im Rahmen dieser Erkrankung wurden Mitte der 1990er-Jahre erstmals A-SMase knockout Mäuse generiert. Dabei wurde festgestellt, dass die Mäuse eine Resistenz gegenüber Bestrahlung, Chemotherapie und anderer stressinduzierter Stimuli der Apoptose besaßen (s. Abb.1). Diese Ergebnisse deutete auf eine wichtige Funktion der Sphingomyelinase für die Zellhomöostase hin (Smith et al. 2008), was Anlass für weitere intensive Untersuchung zur biologischen Funktion dieses Enzyms war. So konnten veränderte A-SMase-Aktivität im Plasma und in den verschiedenen Geweben bei unterschiedlichen Erkrankungen - wie z.B. Depressionen, Herzinsuffizienz, Diabetes, Infektionen und auch der Sepsis - nachgewiesen werden. Erst kürzlich konnten Teichgräber et al. (2008) zeigen, dass die A-SMase bei der Entstehung der zystischen Fibrose involviert ist. Die Arbeitsgruppe stellte fest, dass durch Hemmung der A-SMase mit Amitriptylin eine progressive Entwicklung der Krankheit vermieden werden konnte. Der A-SMase könnte damit ein bedeutender Stellenwert bei der Therapie zukommen.

Neben den o.g. Erkrankungen konnte in verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden, dass die A-SMase eine wichtige Rolle bei Infektionen spielt. Die A-SMase ist bei der Aufnahme unterschiedlicher Erreger wie *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und Rhinoviren in die Zellen

involviert. Sowohl Bakterien als auch Viren führen zu einer raschen Aktivierung und Translokation des Enzyms an die Zelloberfläche. Daraus resultiert eine vermehrte Produktion von Ceramiden und Ausbildung von Ceramid-angereicherten Zonen in der Zellmembran. Diese Bereiche scheinen wichtig für die Internalisierung der Erreger zu sein (Schenck et al. 2007, Jenkins et al. 2009). Der genaue Pathomechanismus konnte allerdings bisher noch nicht eindeutig geklärt werden. Weitere Studien zeigten, dass die A-SMase nicht nur in die Aufnahme der Erreger involviert ist, sondern auch in die Abgabe von Zytokinen sowie die Induktion des Zelltods infizierter Zellen. Dazu konnten Grassme et al. (2003) in einem Tiermodell zeigen, dass die A-SMase nach einer durch *Pseudomonas aeruginosa* hervorgerufenen Infektion vermehrt auf die äußere Membran transloziert wird.

Im Gegensatz dazu kam es bei A-SMase knockout Mäusen zu einer verminderten Internalisierung der *Pseudomonas*-Erreger in das Lungenepithel und damit zu einer verminderten Apoptoserate. Ohne die Internalisierung und Apoptose durch die A-SMase kam es hier zu einem drastischen Anstieg des Zytokins IL-1 β . Durch die verstärkte Entzündungsreaktion erlangten die knockout Mäuse eine schlechtere Überlebensrate.

Die A-SMase scheint nicht nur die Zytokinabgabe zu regulieren, sondern wird auch durch die Zytokine selbst stimuliert. Der infektiöse Stimulus durch TNF- α und IL-1 β durch die Sekretion von A-SMase aus aktivierten Makrophagen und Endothelzellen führte in einem anderen Tiermodell zu einem zwei- bis dreifachen Anstieg der A-SMase-Sekretion ins Plasma (Sudhir et al. 1998).

Bisher wurden wenige klinische Studien über das Verhalten der Sphingomyelinase in humanem Plasma während der Sepsis durchgeführt. Drobnik et al. (2003) zeigten, dass ein erhöhtes Ceramid/Sphingomyelin-Verhältnis bei septischen Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe positiv prädiktiv für eine erhöhte Mortalität war. Dabei wurde der Plasmaspiegel von Ceramiden beim Vorliegen definierter Sepsiskriterien an 3 willkürlich festgelegten Tagen bestimmt. Claus et al. (2005) konnten retrospektiv im Serum einer geringen Zahl von 12 septischen Patienten, verglichen mit einer Kontrollgruppe von 13 Probanden, eine erhöhte Sphingomyelinase-Aktivität nachweisen. In dieser Studie zeigten die nicht überlebenden septischen Patienten signifikant höhere A-SMase-Aktivitäten.

Nach diesen Berichten scheint also die Sphingomyelinase-Aktivität mit dem

Schweregrad einer Sepsis zu korrelieren. Inwiefern die A-SMase als früher diagnostischer Marker der Sepsis und möglicher therapeutischer Angriffspunkt von Bedeutung sein könnte, wurde bislang nicht untersucht. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der A-SMase durch z.B. Steroide und trizyklische Antidepressiva wie Imipramin und Desipramin möglich ist (Göggel et al. 2004). Neben dem PCT, als dem aktuell klinisch angewandten Marker für die Sepsis, könnte die A-SMase im Hinblick auf eine frühzeitige Diagnostik oder sogar als neuer therapeutischer Ansatzpunkt eine neue bedeutende Rolle zukommen.

1.5 Ziel der Studie

Das Ziel dieser Studie ist es, die Aktivität der sezernierten A-SMase erstmalig sowohl prospektiv in einem Kollektiv postoperativer Patienten als auch retrospektiv in einem septischen Patientenkollektiv zu untersuchen. Neben Aussagen über Sensitivität und Spezifität der A-SMase als möglichen Marker für die Sepsis, soll das Ausmaß und die Dynamik des Enzyms in Korrelation mit dem Schweregrad der Sepsis im Verlauf der postoperativen Phase analysiert werden. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen darüber hinaus mit bereits klinisch etablierten Sepsismarkern Procalcitonin und CRP verglichen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Klinischer Teil

2.1.1 Studiendesign

Diese Studie wurde an insgesamt drei Patientenkollektiven durchgeführt. Bei dem ersten Kollektiv handelte es sich um Patienten, die elektiv einer großen abdominal-chirurgischen Operation unterzogen werden mussten. Hierbei handelte es sich um eine prospektive Beobachtungsstudie. Die Patienten wurden anhand des Haupteinschlusskriteriums eines großen abdominal-chirurgischen Eingriffs in die Studie aufgenommen, sofern sie nicht eines der folgenden Ausschlusskriterien erfüllten:

- Schwangerschaft
- Alter < 18 Jahre
- Reanimationsverzicht (DNR)
- Fehlende Einverständniserklärung

In diesem Patientenkollektiv wurden sowohl präoperativ (im Rahmen der Anästhesie-Einleitung) als auch im postoperativen Verlauf an den Tagen 1-5 nach Operation bzw. bei klinisch diagnostiziertem SIRS bzw. Sepsis als postoperative infektiöse Komplikation Blutproben entnommen. Anhand dieser Proben wurde die A-SMase-Aktivität bestimmt. Parallel dazu wurde sowohl die Dokumentation demographischer als auch klinischer Daten zum Krankheitsverlauf durchgeführt.

Das zweite Patientenkollektiv wurde retrospektiv anhand eines PCT-Anstiegs > 2 pg/dl identifiziert und bei Vorliegen einer Sepsis gemäß den ACCP/SCCM Konsensus Konferenz-Kriterien in die Studie aufgenommen. Da die PCT-Proben eine Woche in gefrorenem Zustand im Institut für Immunologie aufbewahrt wurden, konnte auf diese Weise die A-SMase-Aktivität rückwirkend bestimmt werden. Bis maximal zum fünften Tag nach Beginn des PCT-Anstieges wurden die Proben analysiert.

In beiden Studien wurden sowohl CRP- als auch die PCT-Spiegel anhand von routinemäßig durchgeführten Blutentnahmen bestimmt und mittels der Quelldaten dokumentiert.

Bei dem dritten Patientenkollektiv handelte es sich um Patienten einer allgemeinmedizinischen Praxis, die als Kontrollgruppe dienten. Die Patienten verzeichneten keine akuten oder chronischen Erkrankungen. Bei diesen Patienten wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen die A-SMase, PCT und CRP bestimmt.

2.1.2 Patienten der prospektiven Beobachtungsstudie

Nach Zustimmung der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität (CAU) zu Kiel und vorliegender schriftlicher Einwilligung der Patienten bzw. des gesetzlichen Vertreters, wurden insgesamt 49 Patienten der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UK S-H), Campus Kiel, in die prospektive Beobachtungsstudie eingeschlossen. Die Patienten wurden im Zeitraum zwischen April 2007 und Februar 2008 in die Studie aufgenommen. 20 (40,8%) dieser Patienten mussten jedoch wieder ausgeschlossen werden, da der operative Eingriff aufgrund Inoperabilität abgebrochen wurde.

In Tabelle 2 sind die soziodemographischen Daten der Patienten angegeben. Neben Alter, Geschlecht, Diagnose und Art der Operation ist ebenfalls der sog. APACHE-Score aufgeführt. Dieser Wert wird üblicherweise für kritisch kranke Patienten bei Aufnahme auf die Intensivstationen ermittelt, um so einen prognostischen Parameter für die Krankheitsschwere und auch die Überlebenschance dieser Patienten vorherzusagen. Dieses Scoring-System schließt Angaben zum Alter des Patienten, spezifische Laborparameter wie z.B. Kreatininwert und Hämatokrit sowie anamnestische Angaben mit ein (Knaus et al. 1985).

Von den 29 Patienten erkrankten 3 Patienten während ihres Krankenhausaufenthaltes an einer Sepsis (gemäß den ACCP/SCCM Konsensus Konferenz-Kriterien). Patient Nr. 10. wurde innerhalb der ersten 5 postoperativen Tage septisch, wohingegen die Patienten Nr. 12 und 26 erst im späteren postoperativen Verlauf (Nr. 12 an den Tagen 21-23; Nr. 26 an Tag 14-18 und erneut an den Tagen 42-49) das klinische Bild einer Sepsis bzw. einen septischen Schocks zeigten.

Tabelle 2: Demographische Daten der Patienten der prospektiven Studie (n=29)

Geschlecht	männlich: n = 23 weiblich: n = 6	Alter (Jahren)	40-55: n = 6 66-79: n = 11	56-65: n = 10 80-95: n = 2
Diagnose	Ösophaguskarzinom: 5, Boerhave-Syndrom: 1, Magenkarzinom: 11, Duodenumkarzinom: 2, Cholangiokarzinom: 1, Pankreaskarzinom/-metastasen: 3, Pankreatitis: 1, Kolonkarzinom: 4, Analkarzinom: 1,			
Op-Art	Ösophagektomie: 6, subtotale Gastrektomie/Gastrektomie: 5, Gastrektomie mit Teilresektion des Ösophagus: 6, Erweiterte Cholecystektomie 1, Duodenumresektion: 2, Hemikolektomie: 2, Rektumresektion: 2, Whipple: 4, Resektion des Analkarzinom: 1			
APACHE II (1. post-Op Tag)	0-4: 0 5-9: 4 10-14: 18 15-19: 6 20-24: 1 >25: 0	Sepsis Diagnose im Verlauf	ohne Sepsis: 26 mit Sepsis: 3	

Tabelle 3: Demographische Daten der septischen Patienten aus der prospektiven Studie (n=3)

Nr.	Alter	Geschlecht	SAPS-Score	Diagnose
10	82	M	35	Siegelzellringkarzinom, erweiterte Gastrektomie
12	68	M	30	Kardiakarzinom, erweiterte Gastrektomie, Anastomoseninsuffizienz mit lokaler Peritonitis, „second look“ Eingriff mit Kolonübernähung
26	72	M	30/35	Gastrinom im Duodenum, Whipple Operation, zweimalige Anastomoseninsuffizienz mit Lavage und weiterer Diskontinuitätsresektion des Darms, Niereninsuffizienz im Rahmen der Sepsis

2.1.3 Patienten der retrospektiven Studie

Die Patienten der retrospektiven Studie lagen im Zeitraum von Januar bis Juni 2008 auf den Intensivstationen der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie bzw. der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin des UKs S-H, Campus Kiel. Insgesamt wurden 13 Patienten mit einem PCT-Wert > 2 ng/ml identifiziert. 4 der 13 Patienten (30,8%) mussten wieder ausgeschlossen werden, da diese nicht die ACCP/SCCM Konsensus Konferenz-Kriterien einer Sepsis erfüllten. Tabelle 4 zeigt die erhobenen demographischen Daten der Patienten. In dieser Studie wurde der SAPS II Score zur Einschätzung des Krankheitsschweregrades verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Scoresystem, das eine Einschätzung der Erkrankungsschwere von Intensivpatienten auf der Basis physiologischer Daten sowie die Berechnung des Letalitätsrisikos ermöglicht (Agha et al. 2002).

Bis zu 5 Tage nach dem Anstieg des PCTs wurden die Proben ausgewertet. Bei 4 Patienten konnten lediglich bis max. Tag 4 nach PCT-Anstieg Proben untersucht werden, da diese entweder nicht zur Verfügung standen oder der Patient früher verstorben war. Bei 6 Patienten konnte zusätzlich die A-SMase parallel bis zu 3 Tage vor dem PCT-Anstieg bestimmt werden.

Tabelle 4: Demographische Daten der Patienten der retrospektiven Studie (n=13)

Nr.	Alter	Geschlecht	SAPS	Diagnose
1a	65	M	35	4/5 Magenentfernung bei 4-Quadranten Peritonitis bei akuten Abdomen
2a	75	W	30	Nekrotisierende Faszitis am li. Oberschenkel, Fasziotomie, Dilatationstracheotomie
3a	-	-	-	Keine Sepsis
4a	64	M	14	Hämorrhagischer Infarkt mit cerebraler Hämatomausräumung, Respiratorische Insuffizienz, V.a. Aspirationspneumonie
5a	46	W	32	Aszendierende Adnexitis bei Fremdkörper, operative Entfernung des Fremdkörpers und Cholecystektomie, respiratorische Insuffizienz und mehrfache Reanimation/Kardioversion

Nr.	Alter	Geschlecht	SAPS	Diagnose
6a	46	W	23	Frühkindlicher Hirnschaden, Z.n. hämorrhagischem Schock bei Vorfußamputation, Niereninsuffizienz, respiratorische Insuffizienz
7a	-	-	-	Keine Sepsis
8a	56	M	30	Lungentransplantation und Pneumothorax, Pneumonie (Aspergillus), ischämische Kolitis, Nierenversagen, Zytomegalie Infektion
9a	-	-	-	Keine Sepsis
10a	-	-	-	Keine Sepsis
11a	76	M	31	Zystektomie mit Ileumkonduit bei Urothelkarzinom, postoperative therapierefraktäre Harnwegsinfekte, dekompenzierte Niereninsuffizienz, septische Peritonitis bei Ischämie des Dick- u. Dünndarm
12a	48	W	32	Lebertransplantation bei Cholangiozellulärem Karzinom, Pneumonie, Nierenversagen, respiratorische Insuffizienz
13a	62	M	34	septische Peritonitis bei schwerer akuter nekrotisierenden Pankreatitis, Nekrosektomie mit Cholecystektomie, Dünndarmteilresektion, Nierenversagen

2.1.4 Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe wurden 5 Probanden der allgemeinmedizinischen Kooperationspraxis der CAU zu Kiel in Karby in die Studie eingeschlossen. Zum Zeitpunkt (März 2008) der Blutentnahme war bei keinem dieser 5 Probanden eine akute bzw. chronische Erkrankung bekannt. Eine mögliche Operation lag mehr als ein Jahr zurück. Das mittlere Alter der Probanden betrug 55 Jahre, zwei waren weiblichen und drei Probanden männlichen Geschlechts.

2.2 Experimenteller Teil

2.2.1 Probengewinnung

Die Blutentnahmen der retrospektiven und prospektiven Studie erfolgten aus dem zentralen Venenkatheter Arrow-Howes™ Multi-Lumen Central Venous Catheterization Set (Arrow Deutschland GmbH, Erding) oder aus einem der arteriellen Zugänge Arrow Arterial Catheterization Set (Arrow Deutschland GmbH) bzw. BD-Insyte-W (Becton Dickison GmbH, Heidelberg). Die genannten Zugänge wurden von der anästhesiologischen Abteilung des UKs S-H, im Rahmen der Anästhesie-Einleitung präoperativ gelegt. Die Blutentnahmen im Kontrollgruppenkollektiv wurde mit Hilfe einer „Butterfly-Kanüle“ (Vasuflo, Dispomed, Gelnhausen) durchgeführt. Das Blut wurde in einem Serum- und einem Kalium-EDTA-Röhrchen (SARSTEDT, Nümbrecht) aufgefangen.

Im Anschluss an die Entnahme wurde das Serumröhrchen in der Zentrifuge Sorvall®-Super TRI (Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold) für 10 Minuten bei 20°C und 1500 Umdrehungen/min zentrifugiert, um danach das Serum in 4 Röhrchen abzapfettieren und einzufrieren. Die Serumröhrchen wurden bei - 80°C bis zur weiteren Auswertung gelagert.

2.2.2 Auswertung der Blutproben

Im folgenden Abschnitt wird auf die Vorgehensweise zur Bestimmung der A-SMase, PCT und CRP im Laboratorium des immunologischen Instituts der UKSH, Campus Kiel eingegangen.

2.2.2.1 Chemikalien und Lösungen

Bezugsquellen der Chemikalien

Phosphat-gepufferte	Biochrom KG, Berlin
Kochsalzlösung (PBS)	
Bicinchoninsäure (BCA)-	Pierce, Rockford, USA
Proteinbestimmungskit (Reagenz A+B)	
Triton-X-100	Sigma Chemie, Berlin

Natriumacetat (CH_3COONa)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Zinkchlorid (ZnCl_2)	Merck, Darmstadt
Chloroform (CHCl_3)	Merck, Darmstadt
Methanol (CH_3OH)	Merck, Darmstadt
Zink (Zn^{2+})	Merck, Darmstadt
Sphingomyelin	Sigma Chemie, Deisenhofen
N-methyl- ^{14}C -Sphingomyelin	GE Healthcase, München
Szintilationsflüssigkeit (Aquasafe 300 plus)	Zinsser Analytic, Frankfurt
0,9% NaCl	Merck, Darmstadt
Leuko64 Reagenzien (A+B+C)	Trillium Diagnostics
Basiskit LIA Reagenzien	Brahms, Hennigsdorf
Lyophilisierte Tracer	Brahms, Hennigsdorf
LIA Puffer B	Brahms, Hennigsdorf
Procalcitonin (PCT)-Standards	Brahms, Hennigsdorf
PCT-Kontrollen 1+2	Brahms, Hennigsdorf
Humanes Nullserum	Brahms, Hennigsdorf
Waschlösung	Brahms, Hennigsdorf

Puffer und Lösungen

PBS	0,1 M NaH_2PO_4 , pH 7,2, NaCl
	0,15 M NaCl in wässriger Lösung
A-SMase Puffer	250 mM Acetat, 0,1 mM ZnCl_2
	0,1 % Triton X 100, pH 5,0
^{14}C -Substrat	40 μl 10 mM Sphingomyelin,
	160 μl N-methyl- ^{14}C -Sphingomyelin,
	370 KBq/0,5 ml, 8ml A-SMase-Puffer

2.2.2.2 Aktivitätsbestimmungen der sauren Sphingomyelinase

Herstellung des [^{14}C]-Substrat

Es wurden 40 μl 10 mM Sphingomyelin „kaltes“ Substrat mit 160 μl N-methyl-[^{14}C]-Sphingomyelin radioaktives Substrat unter Stickstoff eingedampft. Danach wurden 8 ml A-SMase-Puffer hinzugefügt und das Substrat 15 min im Ultraschallbad inkubiert. Die Substratmenge reichte für 200 Ansätze und musste bei 4°C gelagert werden.

Proteinbestimmung

Die Proteinmenge erfolgte mittels des Bicinchoninsäure (BCA)-Assays. Dazu wurden die Seren je nach Assay mit PBS verdünnt. (EDTA: 1:50; Serum: 1:100). In der Mikrotiter-Platte Nunc-Immuno-plate (NuncTM, Roskilde, Dänemark) wurden pro Well 10 μl PBS vorgelegt. Außerdem wurden 10 μl verdünnten Serums zweifachen Ansatz in die Wells pipettiert. Zusätzlich wurde eine Eichreihe mit 5 bekannten Proteinkonzentrationen Rinderserumalbumin ALBUMIN BOVINE No A-7888 (SIGMA[®] chemical company, St. Louis, USA) in 10 Wells pipettiert. Anschließend wurden die vorliegenden Proben mit je 200 μl der Reaktionslösung, die aus 4 ml Reagenz A und 40 μl Reagenz B bestanden, versetzt. Nach 30 min Inkubation, im Inkubator 3326 Forma Scientific (Forma Scientific, Marietta, USA) bei 37°C wurde die Extinktion bei 570 nm im ELISA-Reader SUNRISETM bzw. dem Infinite[®]M200 (Tecan Austria GmbH, Gröding, Austria) gemessen und mittels der Eichreihe die unbekannten Proteinmengen bestimmt.

Enzymaktivitätsbestimmung der A-SMase der prospektiven Studie (Serum)

Die Aktivitätsbestimmung der A-SMase beruht auf dem Nachweis von [^{14}C]-Phosphorycholin, dem radioaktiv markierten Spaltprodukt aus [^{14}C]-Sphingomyelins, welches im äquimolaren Verhältnis zum Ceramid entsteht. Die tiefgefrorenen Serumproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend auf Eis gelegt. 300 μg Protein wurden in einem Gesamtvolumen von 10 μl im Assay eingesetzt. Es wurden von jedem Serum 3 Proben angesetzt. Danach wurden 100 μl A-SMase Puffer und 40 μl des [^{14}C]-„Substrats“ zugefügt und die Proben 2 Stunden bei 37°C unter ständigem leichtem Schütteln im Wasserbad

Sternkopf inkubiert. Zusätzlich wurden auf die gleiche Art und Weise 3 Ansätze mit reinem PBS ohne Serum angesetzt. Gestoppt wurde die Reaktionen nach der Inkubation mit 750 µl Chloroform / Methanol (2:1) und 300 µl destilliertem Wasser. Diese wurden nacheinander hinzugegeben und jeweils eine Minute mit Vortex Genie 2TM (Bender&Hobein AG, Zürich) aufgewhirrt. Nach 4 Minuten in der Zentrifuge Biofuge (Heraeus Holding GmbH, Hanau) bei 14000 Umdrehungen/min (20.000 g) kam es zur Phasentrennung. Von der oberen, wässrigen Phase wurden 300 µl entnommen und in ein Szintillationsröhrchen überführt. 4 ml Szintillationsflüssigkeit Aquasafe 300 plus (Zinsser Analytic, Frankfurt) wurden hinzugefügt und die β -Strahlung des durch die A-SMase freigesetzten [¹⁴C]-Phosphoryl-Cholins in dem β -Counter Instrument-Typ: LS 6000LL (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) gemessen. Für die Aktivitätsberechnung des reinen Substrats wurden zusätzlich 3 Szintillationsröhrchen mit der 4 ml Szintillationsflüssigkeit und 40 µl Substrat befüllt und im β -Counter die β -Strahlung gemessen.

Enzymaktivitätsbestimmung der A-SMase der retrospektiven Studie (EDTA-Blut)

Die Blutproben der Patienten der retrospektiven Studie waren im Gegensatz zu den Proben der prospektiven Studie routinemäßig nicht zusätzlich in Serumröhrchen, sondern lediglich in einem Blutröhrchen mit EDTA aufgefangen. EDTA ist ein Chelatbildner und kann Komplexe mit Metallionen wie Calcium und Zink eingehen. Das später zu dem A-SMase-Assay zugeführte Zink würde dem Enzym somit nicht mehr vollständig zur Verfügung stehen und die A-SMase könnte nicht ihre optimale Aktivität ausüben. Auch die Calciumionen im Blut reichten nicht aus, um das gesamte EDTA zu komplexieren, so dass noch freies EDTA vorhanden war. Das später zugeführte Zink für den A-SMase-Assay würde damit ebenfalls nicht mehr zur Verfügung stehen. Um die gleichen Bedingungen des Assays zu der prospektiven Studie herzustellen, musste eine Zinkkonzentration ermittelt werden, die zusätzlich zu der üblichen Menge zugefügt werden musste, um das freie EDTA vollständig zu komplexieren. Die für die Reaktion benötigte Zinkmenge wurde sowohl rechnerisch als auch mittels einer Titrationsreihe ermittelt:

Aus der molaren Masse von EDTA (292 g/mol) und der bekannten Masse EDTA in dem Blutröhrchen (1,6 mg) (Mengenangabe laut Hersteller) konnte eine Stoffmenge von 5,48 mmol EDTA im Serum der Proben errechnet werden. EDTA bindet Ca^{2+} im Verhältnis [1:1]. Mit Hilfe der bekannten Mengenangaben von Calcium und der Avogardokonstante (N_A) konnte die Anzahl EDTA, die durch Calcium gebundenen wurde, ermittelt werden.

Bei einer Ca^{2+} -Konzentration im Blut von 8,0-10,4 mg/dl $\approx 0,1$ g/l (Dörner 2006) und einem Molekulargewicht von 40 g/mol, ergab sich eine Stoffmenge von Ca^{2+} in der Blutprobe von 2,5 mmol/l.

$n(X) = \text{Stoffmenge des Stoffes X [mol]}$

$m(X) = \text{Masse des Stoffes X [g]}$

$M(X) = \text{molare Masse des Stoffes X [g/mol]}$

$N_A = 6,02214179 \cdot 10^{23} / \text{mol}$

$X_{(\text{M}\text{Ca}^{2+})} = \text{Molekülanzahl}_{(\text{Ca}^{2+})} \text{ in dem Serumröhrchen}$

$X_{(\text{M}\text{Ca}^{2+})} = n_{(\text{Ca}^{2+})} \cdot N_A$

$$X_{(\text{M}\text{Ca}^{2+})} = \frac{2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot 6 \cdot 10^{23} \text{ Moleküle}}{\text{mol}} = 1,5 \cdot 10^{21} \text{ Moleküle}$$

$$m_{(\text{gebundene EDTA})} = \frac{292 \text{ g} \cdot 1,5 \cdot 10^{21} \text{ mol}}{6 \cdot 10^{23} \text{ mol}} = 73 \cdot 10^{-2} \text{ g}$$

0,73 mg EDTA reagiert mit den gesamten Ca^{2+} -Kationen in dem entnommenen Blut, damit ist 0,87 mg EDTA in dem Blutröhrchen ungebunden.

Bei einer molaren Masse von EDTA von 292 g/mol und der Avogardokonstante, entsprechen 292 g EDTA $6 \cdot 10^{23}$ Moleküle. Somit enthält das freie EDTA bei einer Masse von 0,87 mg $1,7 \cdot 10^{18}$ Moleküle. Auch Zink bildet mit EDTA Komplexe im Verhältnis 1:1, so dass bei einer molaren Masse von 136,28 g/mol $1,7 \cdot 10^{18}$ Moleküle einem Gewicht von $38,61 \cdot 10^{-5}$ g entsprechen. Demnach müssen 0,38 mg ZnCl_2 oder eine Stoffmenge von 2,8 mmol zu der Lösung hinzugefügt werden, um das freie EDTA zu binden.

Zur Überprüfung der Berechnung wurde eine Titrationsreihe anhand einer bekannten A-SMase-Aktivität mit unterschiedlichen Konzentrationen an Zink durchgeführt. Dabei bestätigte die Titrationsreihe das Ergebnis von 2,8 mmol Zink als optimale Zusatzmenge.

Es ergab sich, mittels der Herleitung und der Titrationsreihe, folgender Versuchsablauf für die A-SMase-Assays aus EDTA-Blutproben:

Es wurden 40 µl Serum mit 40 µl 2,8 mmol Zn^{2+} in 0,9 % NaCl bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Mit dieser Lösung - der Grundlösung - wurde in den folgenden Schritten weitergearbeitet. Zur Proteinbestimmung wurde die Grundlösung mit Zink 1:50 verdünnt (2 µl verdünnte Serum, 98 µl Zinklösung). Es wurde anstatt des PBSs (10 µl) 0,9 % NaCl in den Wells vorgelegt. Es wurden je 3 Proben angesetzt. Die durch die Proteinbestimmung bekannte Menge an Serum (µl) für 300 µg Serumprotein wurde auf 30 µl mit der Zink-Lösung aufgefüllt. Im Weiteren wurde 280 µl A-SMase-Puffer hinzugefügt und danach mit dem Vortex aufgewhirlt. Nach Zugabe von 40 µl N-methyl- ^{14}C -Sphingomyelin wurde das Gemisch noch einmal aufgewhirlt und dann 2 Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurden 3 Nullproben mit 30 µl Zink an Stelle des verdünnten Serums angesetzt.

Zur Abtrennung des durch die A-SMase katalysierten wasserlöslichen ^{14}C -Phosphorylcholins von dem übrigen N-methyl- ^{14}C -Sphingomyelin wurde eine Phasenseparation nach Bligh und Dyer (1959) durchgeführt. Dazu wurden den Proben 750 µl Chloroform / Methanolgemisch (2:1) und weiter 100 µl destilliertes Wasser zugegeben und jeweils anschließend vermischt. Zur Phasentrennung wurde für 4 Min. bei 14000 Umdrehungen (20.000 g) zentrifugiert. 400 µl der oberen Phase wurde entnommen und in einem mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit gefülltem Röhrchen pipettiert. Die Proben wurden aufgewhirlt und die Aktivität der wässrigen Phase im β -Counter Instrument-Typ: LS 6000LL (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) die gemessen. Für die Aktivitätsberechnung des eingesetzten Substrats wurden zusätzlich 3 Szintillationsröhrchen mit der 4 ml Szintillationsflüssigkeit und 40 µl ^{14}C -Sphingomyelin befüllt und im β -Counter die Gesamtmenge an eingesetzter Radioaktivität gemessen.

2.2.2.3 PCT-Bestimmung

Im Institut für Immunologie am UK-SH, Campus Kiel, wird zur PCT-Bestimmung das Verfahren des Immunolumineszenzassays der BRAHMS-AG (Hennigsdorf, Berlin) im Luminometer Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, Wildbad) verwendet. Hierzu wurden zwei Antikörper an das PCT-Protein gebunden, wobei der eine an der Röhrchenwand fixiert und der andere lumineszenzmarkiert war. Dazu wurde im Vorfeld der Tracer mit dem LIA Puffer B und die Standards und Kontrollen mit dem Nullserum rekonstruiert. Die nachfolgend verwendeten Teströhrchen (coated tubes) (Brahms, Henningdorf) waren an der Innenseite mit einem anti-PCT-Antikörper versehen. Am Boden der Teströhrchen S1-S6 wurden 20 µl PCT-Standard mit steigender Konzentration pipettiert. In die Röhrchen K1 und K2 je 20 µl wurden die entsprechende Kontrollen K1 und K2 und in die nummerierten Röhrchen je 20 µl Probandenserum pipettiert. Danach wurde in alle Teströhrchen 250 µl von dem Tracer mit dem lumineszenzmarkiertem-anti-PCT-Antikörper dazugegeben. Nach gründlichem Schütteln mit dem Rotamax 120T (Heidolph, Schwabach) wurden die Röhrchen mit Klebefolie abgedeckt und 1h – 1h15 min unter ständigem schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Hierzu befanden sich die Proben lichtabgedeckt auf dem Rotamax. Während der Inkubation bildeten sich Komplexe mit den beiden Antikörpern und dem PCT. Um die überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurde nach der Inkubationszeit 4malig 1 ml Waschlösung hinzugefügt und danach dekantiert. Die noch vorhandene Flüssigkeit wurde durch kräftiges Abklopfen auf einem Zellstoff entfernt. Anschließend wurden im Luminometer die LIA-Basiskits 1 und 2 hinzugefügt. Die Lumineszenz des gekoppelten Antikörpers konnte mit dem Luminometer detektiert und der Procalcitonin Gehalt im Meßbereich von 0,1-900 ng/ml bestimmt werden. Die Größe der Lumineszenzsignale ist mit den PCT-Konzentrationen der jeweiligen Probe direkt proportional. Damit können Konzentrationen über die mitgeführten Standardlösungen mit bekannten PCT-Werten berechnet werden.

2.2.2.4 CRP-Messung

Die CRP-Messung wurde im Zentrallabor des UKs S-H, Campus Kiel, mit Hilfe von einem Immunologischen Trübungstest nach der Standardarbeitsanweisung – SAA-UV-ML-012/C durchgeführt. Die für das Verfahren notwendigen Reagenzien und das Analysegerät Hitachi Modular stammten von der Firma Roche Diagnostics GmbH aus Mannheim. Das hierfür benötigte Blut wurde in einer Li-Heparin-Monovette (SARSTEDT, Nümbrecht) entnommen. Das Blut für die CRP-Messung ist täglich routinemäßig von dem Intensivpersonal des UKs S-H, Campus Kiel, abgenommen worden.

2.2.3 Statistik

Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Statistikprogramme Excel 2007 von Microsoft (Redmond, USA) und SPSS 11.5 (SPSS GmbH Software, München). Die Mittelwerte, Standardabweichung, Median, untere und obere Quantilen wurden unter Verwendung von Excel berechnet. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mit Hilfe des SPSS-Programms. Da wir nicht von einer Normalverteilung der Werte ausgehen konnten, wurde die Signifikanzberechnung bei einem Vergleich der Parameter *unterschiedlicher* Patientenkollektive mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Bei einem Vergleich von unterschiedlichen Tagen innerhalb *eines* Patientenkollektivs wurde der Wilcoxon-Rang-Test verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Postoperative Phase (prospektive Beobachtungsstudie)

3.1.1 Einfluss der Tumorerkrankung auf die A-SMase-Aktivität

Um einen möglichen Einfluss der zugrundeliegenden Erkrankung (Tumorerkrankung) vor der Operation auf die A-SMase-Aktivität im Serum zu untersuchen, wurden die präoperativ erhobenen A-SMase-Aktivitäten (Baseline) - der an einem Tumor erkrankten Patienten der prospektiven Studie ($n = 28$) - mit den A-SMase Werten der Kontrollgruppe ($n = 5$) (gesunde Probanden) verglichen. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der A-SMase-Aktivität zwischen Kontrollgruppe und erkranktem Patientenkollektiv vor der Operation (Kontrollgruppe: 772 ± 455 pmol/ml*h (MW \pm SD), tumorerkrankte Patienten: 790 ± 182 pmol/ml*h), (s. Abb.2). Die PCT und CRP Werte aller Probanden der Kontrollgruppe lagen im Referenzbereich (PCT < 0,5 ng/ml, CRP < 10 mg/l). Bei den tumorerkrankten Patienten fand sich bei einem Patienten (Nr. 38) ein bereits präoperativ erhöhtes PCT sowie bei 5 Patienten erhöhte CRP-Werte (Nr. 3, 4, 6, 17, 43).

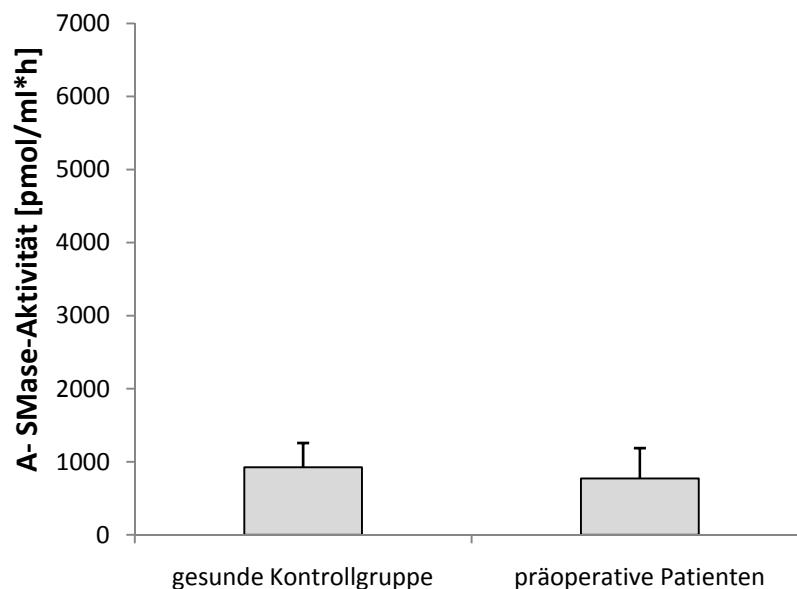


Abb. 2: Vergleich der A-SMase-Aktivität der Kontrollgruppe ($n=5$) mit den tumorerkrankten Patienten präoperativ ($n=28$)

3.1.2 Einfluss der Operationsart auf die A-SMase-Aktivität und das PCT

Um den möglichen Einfluss der Operationsart auf die Höhe des A-SMase und PCT-Anstiegs zu beurteilen, wurden die Patienten der prospektiven Beobachtungsstudie ohne eine Sepsis oder mit einer SIRS im Verlauf in Gruppen entsprechend den verschiedenen Arten der Operation aufgeteilt. Folgende Einteilung der Operation wurde vorgenommen: Darmresektionen / Resektion des Analkarzinom, Gastrektomie, erweiterte Gastrektomie mit partieller Resektion des Ösophagus, Ösophagektomie, Whipple / Pankreatektomie / erweiterte Cholecystektomie mit partieller Pankreasresektion.

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit der verschiedenen Operationsarten. Das PCT lag allerdings nur nach den Darmresektionen > 2 ng/ml und die A-SMase zeigte die höchsten Werte in der Gruppe der Whipple / erweiterte Cholecystektomie mit partieller Pankreasresektion (s. Abb.3).

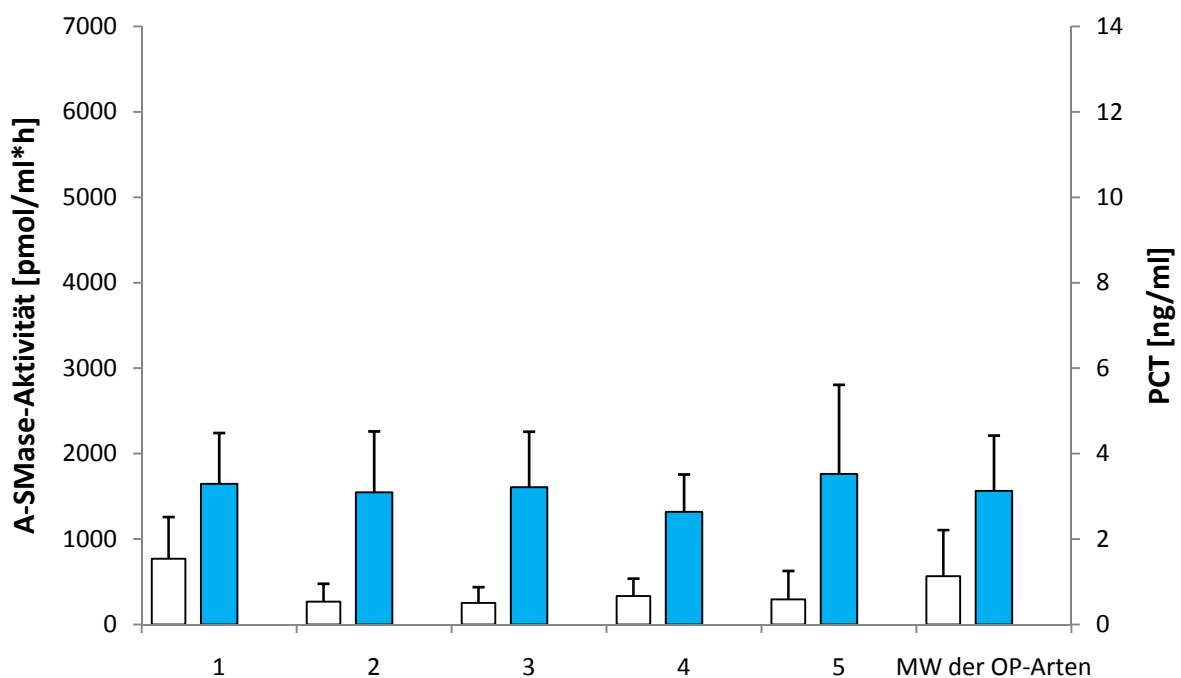


Abb. 3: □ PCT und ■ A-SMase-Aktivität der Patienten ohne eine Sepsis oder mit einer SIRS im Verlauf am ersten postoperativen Tag in Abhängigkeit der Operationsart: 1. Darmresektion/ Resektion des Analkarzinoms (n=7) 2. Gastrektomie (n=5), 3. erweiterte Gastrektomie mit partieller Resektion des Ösophagus (n=4), 4. Ösophagektomie (n=6), 5. Whipple/ erweiterte Cholecystektomie mit partieller Pankreasresektion (n=4), MW (Mittelwert) aller OP-Arten (26)

3.1.3 A-SMase-Aktivität, CRP und PCT im postoperativen Verlauf

Durch die Betrachtung des postoperativen Verlaufs aller 29 Patienten aus der prospektiven Beobachtungsstudie ergaben sich jeweils 3 Gruppen. Die erste Gruppe ($n_1=11$) bildeten die Patienten, bei denen im postoperativen Verlauf keine Sepsis anhand der o.g. Sepsis-Kriterien diagnostiziert wurde. Die zweite Gruppe ($n_2=16$) bestand aus Patienten, die SIRS-Kriterien erfüllten. Die dritten Gruppe ($n_3=3$) bestand letztlich aus Patienten, die im postoperativen Verlauf eine Sepsis nach den Kriterien der ACCP/SCCM Konsensus-Konferenz entwickelten.

Vergleich der postoperativen A-SMase-Aktivität

Der Mittelwert der A-SMase-Aktivität lag präoperativ (Baseline) bei $754,2 \pm 434$ pmol/ml*h (s. Abb.4). In der Gruppe der Patienten ohne Sepsis und der Gruppe der Patienten mit SIRS-Kriterien wurde am ersten postoperativen Tag ein signifikanter Anstieg zum Ausgangswert gemessen ($p < 0,01$). Auch in der Gruppe der Patienten mit Sepsis wurde ein Anstieg gemessen. Aufgrund der kleinen Fallzahl konnte in dieser Gruppe lediglich eine deskriptive Statistik vollzogen werden. Die A-SMase-Aktivitäten stiegen bei allen Patienten wie folgt an: Patienten ohne Sepsis: von $780,9 \pm 436$ pmol/ml*h auf 1343 ± 486 pmol/ml*h; SIRS: von 852 ± 387 pmol/ml*h auf 1701 ± 720 pmol/ml*h; Sepsis: von 139 ± 42 pmol/ml*h auf 1506 ± 691 pmol/ml*h. Die niedrigen Baselinewerte der Patienten, die später eine Sepsis entwickelten konnten nicht erklärt werden. Die Aktivitäten stiegen im Verlauf nach der Operation bis zu einem Maximum (Patienten ohne Sepsis: 1908 ± 670 pmol/ml*h; SIRS: 2238 ± 759 pmol/ml*h; Sepsis: 1824 ± 658 pmol/ml*h) an und fielen danach bei fast allen Patienten wieder ab. Die Maxima wurden an unterschiedlichen Tagen erreicht (Tag 1: 23%; Tag 2: 15%; Tag 3: 15%; Tag 4: 23%; Tag 5: 23%). Die A-SMase Werte im postoperativen Verlauf der Gruppe der SIRS-Patienten und der Patienten ohne Sepsis unterschieden sich dabei nicht.

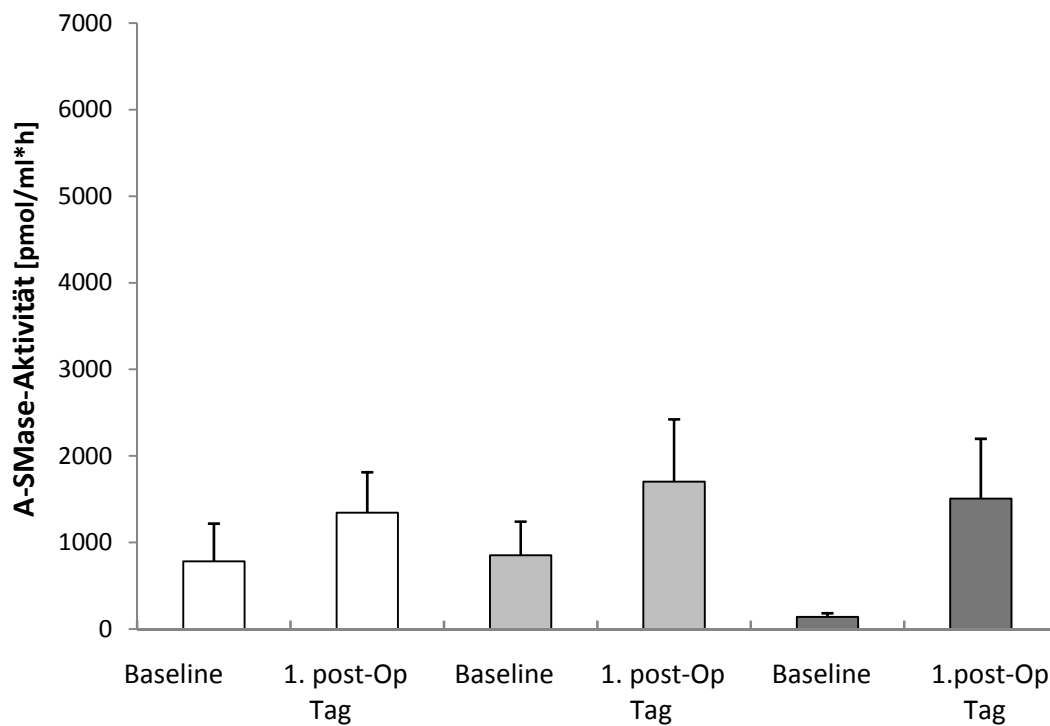


Abb. 4: Vergleich der A-SMase-Aktivität am präoperativen (B=Baseline) und ersten postoperativen Tag; □ Patienten ohne Sepsis (n=11), ■ Patienten mit SIRS (n=16), ■ Patienten mit Sepsis (n=3)

Vergleich der postoperativen CRP-Werte

Das CRP, als unspezifischer Entzündungsmarker, stieg am ersten Tag bei allen Patienten an (keine Sepsis: $3,17 \pm 2,56$ mg/l auf $105,41 \pm 35,51$ mg/l; SIRS: $8,76 \pm 11,44$ mg/l auf $125,62 \pm 49,32$ mg/l; Sepsis: $2,03 \pm 2,41$ mg/l auf $124,63 \pm 64,95$ mg/l) (s. Abb.5). Die höchsten Werte innerhalb der 5 Tage erreichten 63% der Patienten am 2. Tag und 33% am 3. Tag. Ein verzögertes Abfallen des CRPs führte dazu, dass kein Patient am 5. postoperativen Tag unter dem Referenzwert von < 10 mg/l lag. Unterschiede in dem Verlauf oder in dem Ausmaß des Anstieges des CRPs zwischen den einzelnen Gruppen waren im postoperativen Verlauf nicht zu messen.

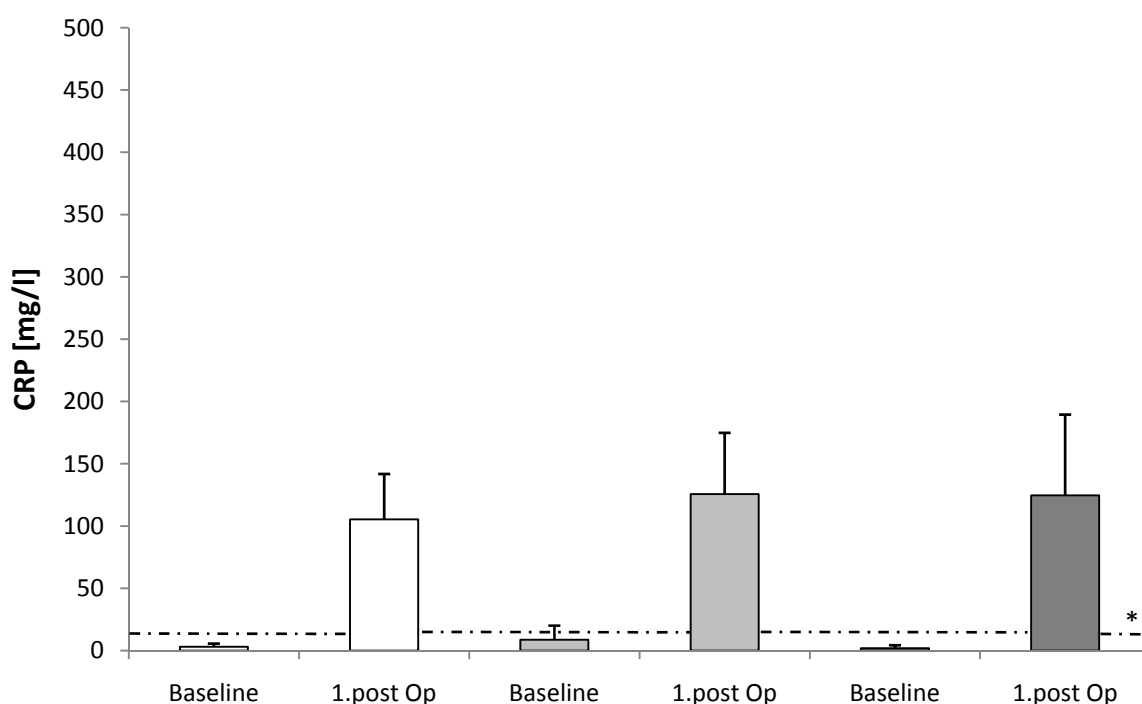


Abb. 5: CRP (Referenzbereich <10 mg/l) am präoperativen (B=Baseline) und ersten postoperativen Tag im Vergleich: □ Patienten ohne Sepsis (n=11), ▒ Patienten mit SIRS (n=16), ■ Patienten mit Sepsis (n=3); * Referenzwert CRP: 10 mg/l

Vergleich der postoperativen PCT-Werte

Die Baselinewerte vor der Operation betrugen bei allen Patienten $< 0,5$ ng/ml. Am ersten Tag stiegen sie bei allen Patienten an (ohne Sepsis: $0,86 \pm 0,79$ ng/ml; SIRS; $0,9 \pm 0,72$ ng/ml; Sepsis: $2,49 \pm 1,82$ ng/ml) ($p < 0,01$) (s. Abb.6). 64% der Patienten bei den hier angewandten abdominalen Operationsverfahren erreichten dabei bereits den Maximalwert im postoperativen Verlauf am ersten Tag.

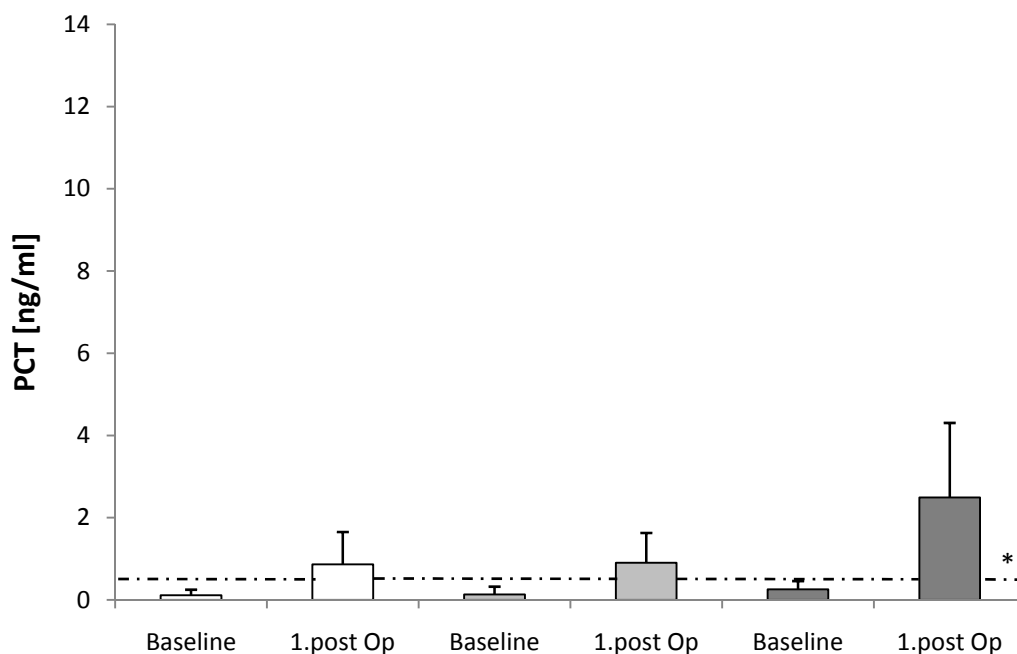


Abb. 6: Vergleich der PCT-Werte am präoperativen (B=Baseline) und 1. postoperativen Tag

□ Patienten ohne eine Sepsis (n=11), ■ Patienten mit einer SIRS (n=16), ■ Patienten mit Sepsis (n=3);

* Referenzwert des PCT: 0,05 pg/ml

Sowohl in der prospektiven- als auch in der retrospektiven Studie wurde bei allen Patienten initial eine Operation durchgeführt. Da auch bei den Patienten der retrospektiven Studie routinemäßig PCT-Bestimmungen postoperativ durchgeführt wurden, konnten somit die PCT-Werte am 1. postoperativen Tag aus beiden Studien mit in die Auswertung aufgenommen werden (s. Tab.5)

Bei der Betrachtung des postoperativen Verlaufes der PCT-Werte im Vergleich der einzelnen Gruppen (keine Sepsis, SIRS, Sepsis) untereinander fiel auf, dass diejenigen Patienten, die im postoperativen Verlauf eine Sepsis ($2,49 \pm 1,82$ ng/ml) entwickelten, bereits initial am 1. postoperativen Tag höhere PCT-Werte erreichten als die Patienten ohne Sepsis ($0,86 \pm 0,79$ ng/ml) oder mit SIRS ($0,9 \pm 0,72$ ng/ml).

Tabelle 5: PCT am 1. postoperativen Tag

PCT-Konzentration	< 2 ng/ml	≥ 2 ng/ml
Sepsis (n=12)	1	11
SIRS (n=16)	15	1
Keine Sepsis/kein SIRS (n=10)	9	1

3.2 Einfluss der Sepsis auf die A-SMase-Aktivität und das PCT

In diesem Kapitel wird der Einfluss der Sepsis auf die A-SMase-Aktivität und das PCT beschrieben. Für die statistische Auswertung wurden die septischen Patienten beider Studien mit einbezogen. Die A-SMase-Aktivitäten wurden dabei im Vergleich zum präoperativen Wert (Baseline) (825 ± 403 pmol/ml*h), dem 1. postoperativen Tag (1563 ± 649 pmol/ml*h) und den Maximalwerten während der postoperativen Tage (2111 ± 731 pmol/ml*h) der Patienten der prospektiven Studie ohne Sepsis und mit SIRS dargestellt (s. Abb. 7). Das PCT wurde dagegen im Vergleich zum bekannten Referenzwert (0,5 ng/ml) dargestellt.

Anhand einer anschließenden Kasuistik wird genauer auf einige septischen Patienten eingegangen, bei denen sich ein A-SMase Anstieg vor dem PCT-Anstieg zeigte. Dabei wird zunächst auf die Patienten der prospektiven Beobachtungsstudie eingegangen, im Weiteren dann auf die Ergebnisse der Patienten der retrospektiven Studie.

3.2.1 Prospektiv und retrospektive Studie (Statistik): nicht septische versus septische Patienten

Um den Einfluss der Sepsis gegenüber dem Operationstrauma auf die einzelnen Parameter beurteilen zu können, wurden die Maxima während der Sepsis, dem Baseline, dem 1. postoperativen Tag und dem Maxima des postoperativen Verlaufes gegenübergestellt. Bei den septischen Patienten handelte es sich dabei um alle septischen Patienten, sowohl aus der retrospektiven als auch aus der prospektiven Studie.

A-SMase-Aktivität

Der Vergleich der Aktivitäten während der Sepsis mit den o. g. Parametern ergab die höchsten Aktivitäten während der septischen Phase (4112 ± 2075 pmol/ml*h). Die Maxima der septischen Tage lagen signifikant über den Maxima der postoperativen Tage ($p \leq 0,01$) (2111 ± 731 pmol/ml*h), signifikant über denen des 1. postoperativen Tages ($p \leq 0,01$) (1563 ± 649 pmol/ml*h) und signifikant über denen der Baselineaktivität ($p \leq 0,01$) (825 ± 403 pmol/ml*h) (s. Abb.7).

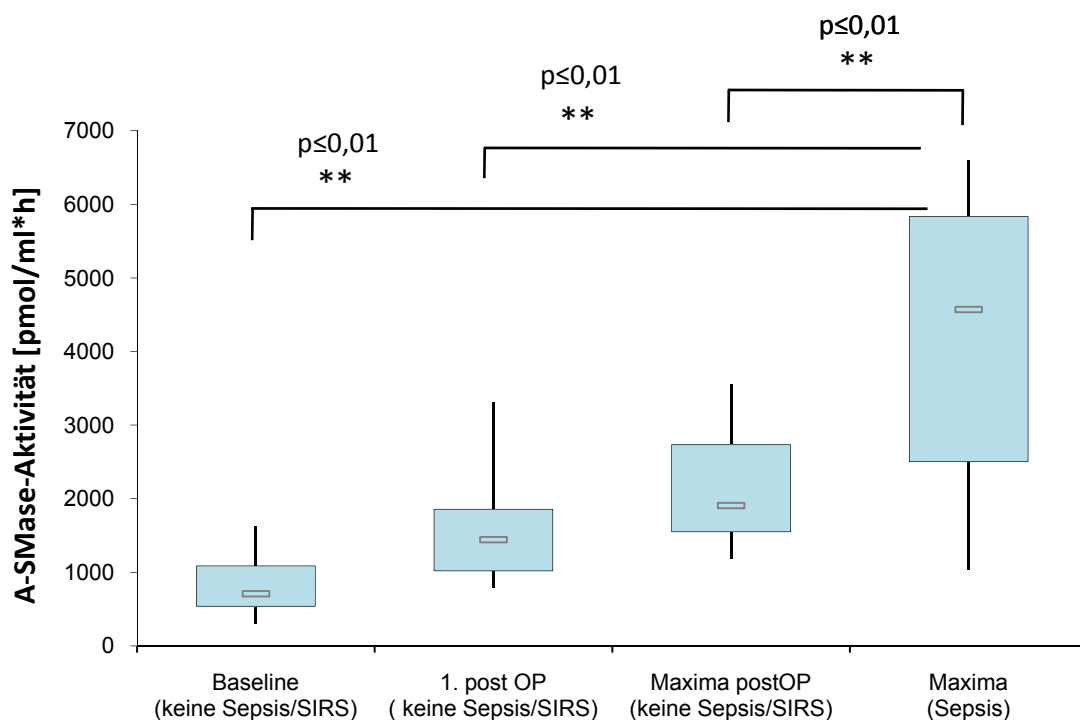


Abb. 7: A-SMase-Aktivität: Patienten ohne Sepsis (n=26) am präoperativen, am 1. postoperativen Tag, Maxima während der postoperativen Tage sowie Patienten mit Sepsis: Maxima während der Sepsis (n=12)

Zum Vergleich der Patienten ohne Sepsis aber mit SIRS und der Maxima während der Sepsis, konnte eine Sensitivität von 83% und Spezifität von 100% berechnet werden. Ein möglicher Cut-off-Wert für die Diagnose Sepsis könnte der Wert 1625 pmol/ml*h sein (Mittelwert + 2 x Standardabweichung der Baselinewerte von den Patienten ohne Sepsis und mit SIRS)

CRP

Das CRP erreichte während der septischen Phase die höchsten Werte im Plasma. Der Unterschied zu den Maximalwerten während der postoperativen Tage war jedoch nicht signifikant im Gegensatz zum PCT und zu der A-SMase-Aktivität. Der Unterschied zwischen dem 1. postoperativen Tag und der septischen Phase ($p \leq 0,05$) und der Baseline und der septischen Phase waren jedoch signifikant ($p \leq 0,01$) (s. Abb. 8).

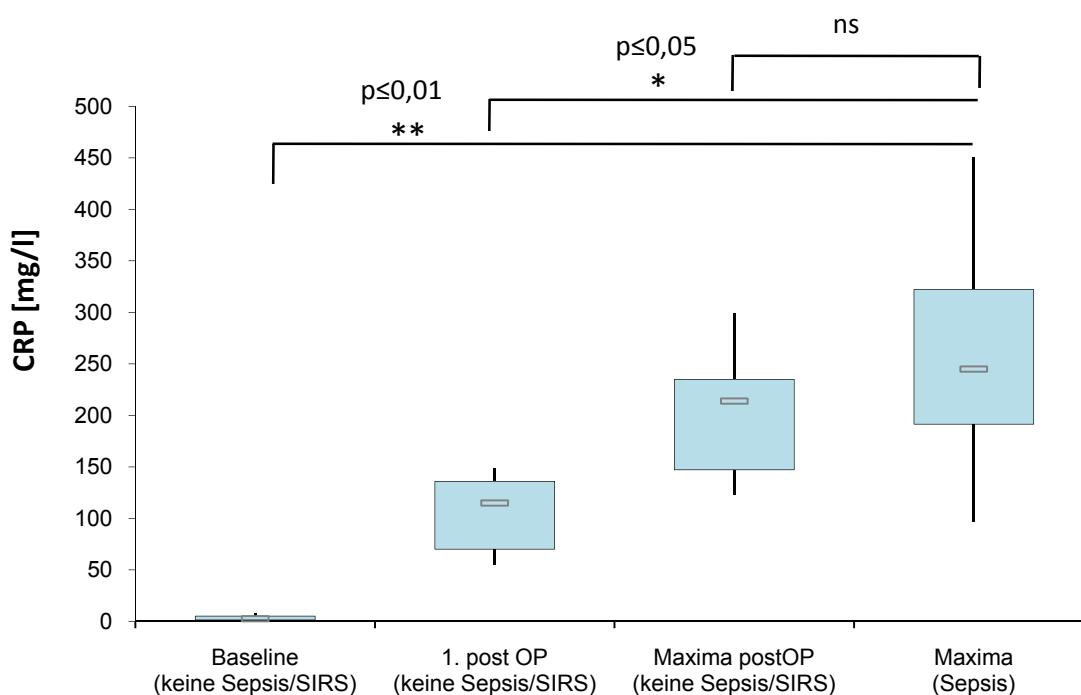


Abb. 8: CRP: Patienten ohne Sepsis (n=26) am präoperativen, am 1. postoperativen Tag, Maxima während der postoperativen Tage sowie Patienten mit Sepsis: Maxima während der Sepsis (n=12); ns: nicht signifikant

PCT

Die höchsten PCT-Werte wurden während der septischen Phase erreicht ($15,49 \pm 19,72$ ng/ml). Mit einer Signifikanz von $p \leq 0,01$ lag das PCT der septischen Phase über den PCT-Werten der Baseline ($0,13 \pm 0,17$ ng/ml), des 1. postoperativen Tages ($0,89 \pm 0,73$ ng/ml) als auch über den Maxima des Verlaufes der 5 postoperativen Tage ($0,98 \pm 0,78$ ng/ml) (s. Abb.9). Ein Maximalwert während der septischen Phase lag mit 364 ng/ml deutlich über den anderen Werten. Aus diesem Grund wurde der Ausreißer nicht mit in der Berechnung berücksichtigt.

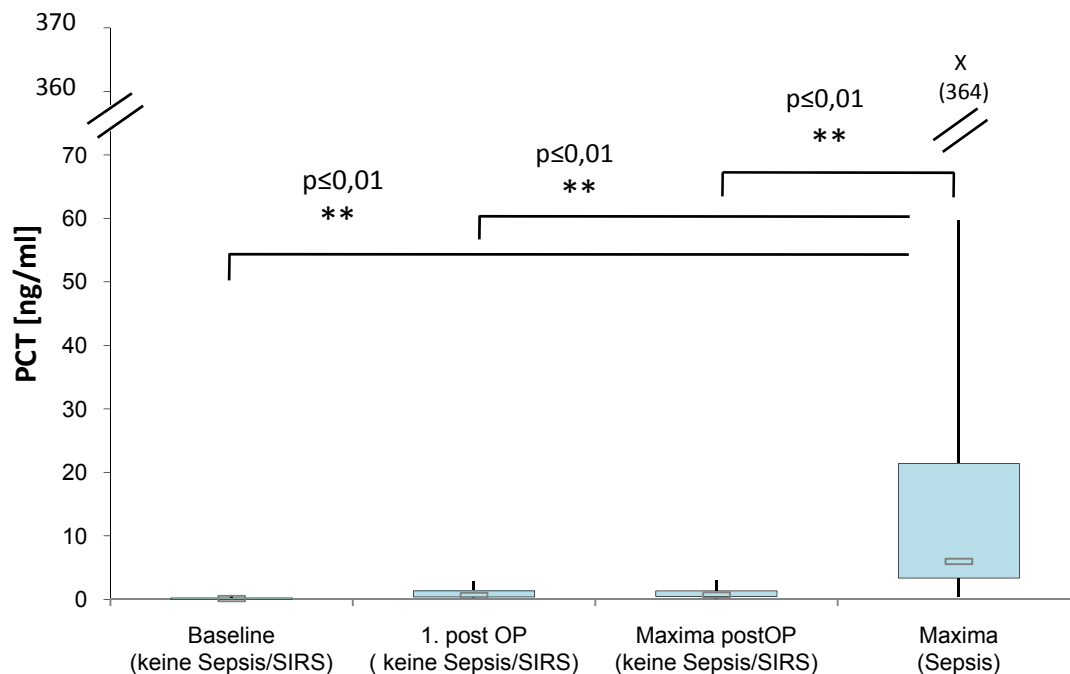


Abb. 9: PCT: Patienten ohne Sepsis (n=26) am präoperativen, am 1. postoperativen Tag, Maxima während der postoperativen Tage sowie Patienten mit Sepsis: Maxima während der Sepsis (n=12)

3.2.2 Prospektive Studie (Kasuistik): Einfluss der Sepsis auf die A-SMase-Aktivität und das PCT

Die A-SMase-Werte während der Sepsis (4112 ± 2075 pmol/ml*h) waren signifikant höher ($p \leq 0,01$) als die Werte vor Operation (825 ± 400 pmol/ml*h) und die Maximalwerte nach der Operation (2111 ± 731 pmol/ml*h) bei den Patienten ohne septische Komplikation. Auch das PCT lag während der Sepsis ($15,49 \pm 19,72$ ng/ml) signifikant höher ($p \leq 0,01$) als die Werte vor Operation ($0,13 \pm 0,17$ ng/ml), und die Maximalwerte nach der Operation ($0,98 \pm 0,78$ ng/ml) bei den Patienten ohne septische Komplikation. Sowohl die A-SMase-Aktivität als auch das PCT stiegen im Verlauf nach der Operation bis zu einem Maximum an und fielen danach im unterschiedlichen Ausmaß wieder ab. Der Verlauf des PCT und der A-SMase wurde in Kapitel 3.1.3 weiter näher erläutert.

Im postoperativen Verlauf der prospektiven Studie wurden insgesamt 3 Patienten anhand der ACCM/SCCP-Kriterien mit einer Sepsis diagnostiziert (Patienten Nr. 10, 12 und 26), die im folgenden Abschnitt näher erläutert werden.

Bei Patient Nr. 10 wurde eine erweiterte Gastrektomie durchgeführt. Dieser Patient erfüllte die Kriterien einer Sepsis am 2. und 3. postoperativen Tag. Im Vergleich zu den beiden anderen Patienten bestand zu keiner Zeit ein septischer Schock. Außerdem fanden sich bei diesem Patienten nur diskret erhöhte A-SMase-Aktivitäten (Tag 1: 721 ± 15 pmol/ml*h Tag 2: 1034 ± 58 pmol/ml*h, Tag 3: 658 ± 14 pmol/ml*h, Tag 4: 1115 ± 61 pmol/ml*h, Tag 5: 789 ± 67 pmol/ml*h, Tag 6: 929 ± 43 pmol/ml*h) im Vergleich zum Baseline-Wert. Im Gegensatz dazu stieg das PCT jedoch im Rahmen der Sepsis über den Referenzwert auf 3,82 ng/ml an.

Bei Patient Nr. 12 wurde auf Grund eines Cardiakarzinoms eine Gastrektomie mit distaler Ösophagusresektion durchgeführt. An Tag 21 kam es zu einer Anastomosensuffizienz mit lokaler Peritonitis, die mit anschließender Lavage im Rahmen eines „second-Look“-Eingriffes verschlossen wurde. Dennoch entwickelte der Patient einen septischen Schock, der bis Tag 24 unter entsprechender Kreislauftherapie intensivmedizinisch behandelt wurde. In diesen Tagen (Tag 21-24) konnten sowohl ein erhöhtes PCT (bis 1,38 ng/ml), als auch erhöhte A-SMase-Aktivitäten (bis 2531 ± 95 pmol/ml*h) gemessen werden (s. Abb.10). Allerdings stieg das PCT nicht über 2 ng/ml. Die A-SMase-Aktivität lag nicht oberhalb der postoperativen Maximalwerte, war jedoch im Vergleich zum Baselinewert und über den Mittelwerten des 1. postoperativen-Tages erhöht.

Auffällig ist bei diesen Patienten aber, dass die A-SMase vor der eigentlichen septischen Phase (Tag 2-5) bereits erhöht waren, während das PCT hier noch unter dem Referenzwert lag (s. auch Patient 26, Abb. 11).

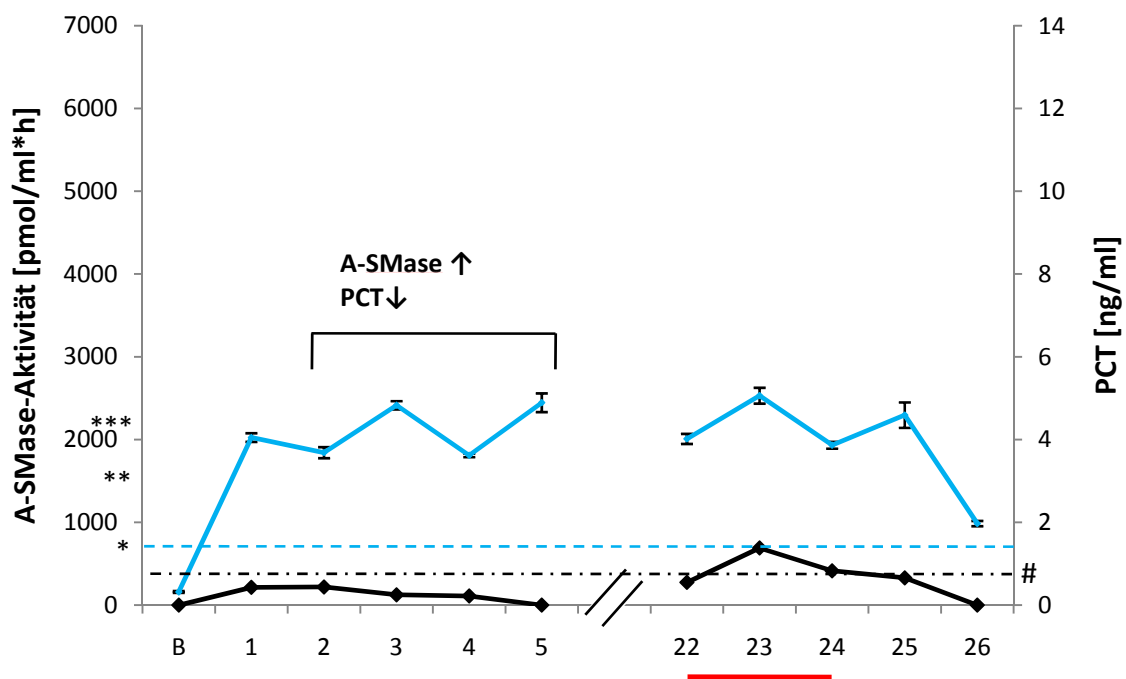


Abb. 10: ◆ A-SMase-Aktivität und ◆ PCT im postoperativen Verlauf von Patient 12 der prospektiven Studie; Sepsis von Tag 21-24 (Tag 21: „second look-OP“)

Referenzwerte: # PCT (0,5 ng/ml) und A-SMase-Aktivität der Patienten ohne Sepsis und mit SIRS:

*Baseline, **1. postoperative Tag, ***Maxima der postoperativen Tage, — Sepsis

Patient Nr. 26 entwickelte an den Tagen 14-19 und 43-50 einen septischen Schock. Bei diesem Patienten war initial bei einem Gastrinom im Duodenum eine Whipple-Operation mit Sigmaresektion und atypischer Leberteilresektion durchgeführt worden. Grund für die jeweilige Sepsis war eine Anastomoseninsuffizienz. Neben der durch die Sepsis bedingten Kreislaufinsuffizienz entwickelte der Patient an den Tagen 43-50 zusätzlich ein Nierenversagen als sekundäre Organdysfunktion, die mittels kontinuierlicher Hämodialyse behandelt wurde.

Wie in Abb. 11 dargestellt, stieg das PCT sowohl am 1. postoperativen Tag (3,27 ng/ml) als auch während der beiden Episoden der Sepsis auf > 2 ng/ml an (erste Phase: max. 3,49 ng/ml; zweite Phase: 13,3 ng/ml). Die A-SMase-Aktivität stieg ebenfalls nach der Operation (1771 ± 114 pmol/ml*h) und während der Sepsis (erste Phase: max. 1566 ± 191 pmol/ml*h, zweite septische Phase: max. 6594 ± 236 pmol/ml*h) über den Baselinewert an. Entsprechend dem PCT fiel auch die A-SMase-Aktivität nach diesem maximalen Anstieg wieder ab, stieg jedoch im Verlauf wieder an und persistierte sowohl direkt nach der Operation als auch nach der ersten septischen Phase auf diesem erhöhten Niveau. Auch bei diesem Patienten finden sich erhöhte A-SMase-Werte bei gleichzeitig erniedrigten PCT-Werten.

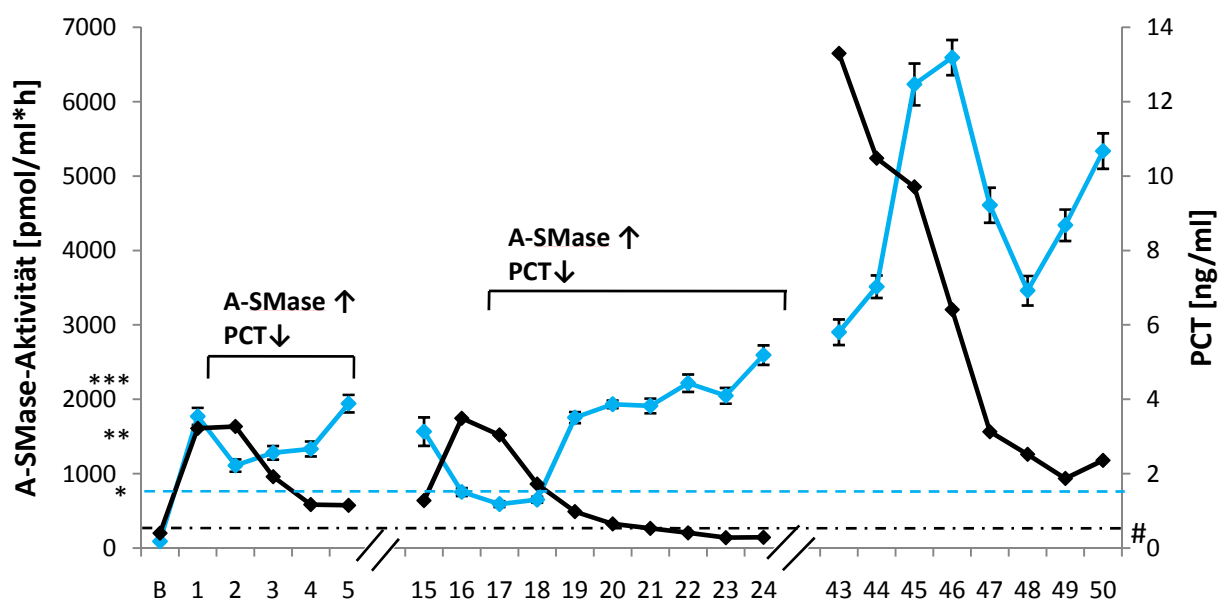


Abb. 11: ◆ A-SMase-Aktivität und ◆ PCT von Patient 26 der prospektiven Studie; Sepsis von Tag 14-19, 43-50 (Tag 15+42 Relaparotomie)

Referenzwerte: # PCT (0,5 ng/ml) und A-SMase-Aktivität der Patienten ohne Sepsis und mit SIRS:

* Baseline, **1. postoperative Tag, ***Maxima der postoperativen Tage, — Sepsis

3.2.3 Retrospektive Studie (Kasuistik): Einfluss der Sepsis auf die A-SMase-Aktivität und das PCT

Aufgrund der Sepsis zeigten sich auch bei allen Patienten der retrospektiven Studie erhöhte A-SMase-Aktivitäten. Besonders hervorzuheben ist die erhöhte A-SMase-Aktivität vor Beginn des PCT-Anstieges > 2ng/ml. Bei 6 (Patient Nr. 2a, 4a, 5a, 8a, 12a und 13a) der 9 Patienten konnten bis zu 2 Tagen vor dem Anstieg des PCTs die A-SMase-Aktivität gemessen werden. An diesen 2 Tagen lagen die Aktivitäten bei fünf der sechs Patienten (Patient Nr. 4a, 5a, 8a, 12a und 13a) im erhöhten Bereich über dem Baselinewert, dem Wert des 1. postoperativen Tages als auch der postoperativen Maximalwerte der prospektiven Studie (s. Abb. 12).

Diese fünf Patienten werden im Weiteren als Kasuistik näher beschrieben.

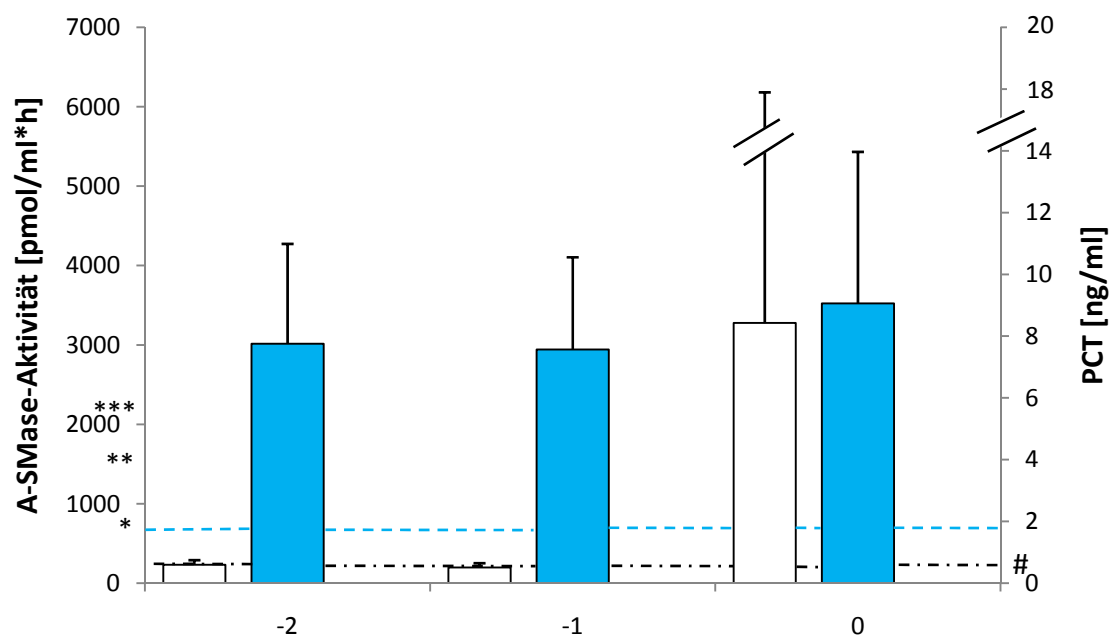


Abb. 12: ◇ PCT und ◆ A-SMase-Aktivität von 6 Patient (Nr. 2a, 4a, 5a, 8a, 12a und 13a) an 2 Tagen (Tag -2 und -1) vor dem PCT Anstieg > 2 ng/ml (Tag 0)

Referenzwerte: # PCT (0,5 ng/ml) und A-SMase-Aktivität der Patienten ohne Sepsis und mit SIRS:

*Baseline, **1. postoperative Tag, ***Maxima der postoperativen Tage

Proband 4a erlitt 1 Monat vor Studienbeginn einen hämorrhagischen Apoplex gefolgt von einer respiratorischen Insuffizienz. Zwei Tage vor Studienbeginn bestand der Verdacht auf eine Aspirationspneumonie. Am 1. Tag der Studie wurde eine plastische Tracheotomie durchgeführt. Der Patient entwickelte an Tag 4 eine Sepsis bevor er an Tag 6 verstarb. Bei diesem Patienten stieg das PCT zu Beginn der Sepsis an Tag 3 von 0,31 ng/ml kontinuierlich bis auf 5,97 ng/ml am 6. Tag an (s. Abb. 13). Dagegen lag die A-SMase-Aktivität vor Sepsisbeginn bereits deutlich über dem Baselinewert, dem Wert des 1. postoperativen Tages und den Maxima der postoperativen Tage der Patienten ohne Sepsis und mit SIRS (Tag 1: 3611 ± 79 pmol/ml*h Tag 2: 4469 ± 58 pmol/ml*h, Tag 3: 3494 ± 147 pmol/ml*h). Zu Beginn der Sepsis an Tag 4 stieg die A-SMase-Aktivität entsprechend dem PCT noch weiter auf 5468 ± 163 pmol/ml*h an.

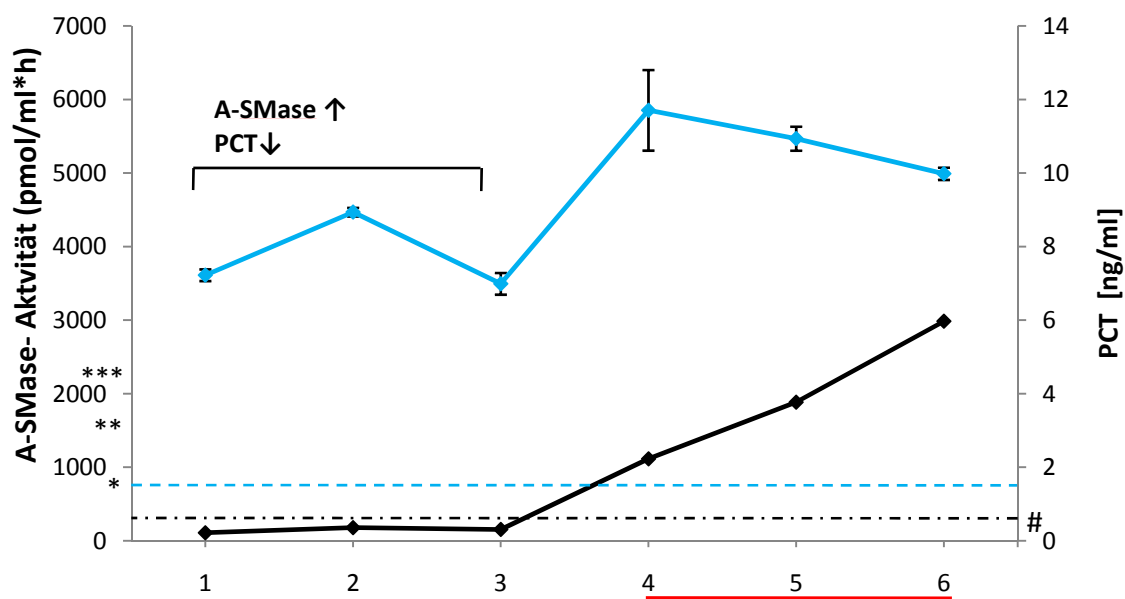


Abb. 13: ◆ A-SMase-Aktivität und ◆ PCT von Patient 4a der retrospektiven Studie; Sepsis von Tag 4-6; (Tag 1: plastische Tracheotomie, Tag 6: verstorben)

Referenzwerte: # PCT (0,5 ng/ml) und A-SMase-Aktivität der Patienten ohne Sepsis und mit SIRS:

*Baseline, **1. postoperative Tag, ***Maxima der postoperativen Tage, — Sepsis

Patientin 5a (s. Abb. 14) entwickelte eine Sepsis nach Hysterektomie bei initial bestehender Adnexitis. Im Rahmen der Sepsis musste die Patienten aufgrund maligner Herzrhythmusstörungen reanimiert und intubiert werden. Zum Studienbeginn bis zum 6 Tag erfüllte die Patientin klinisch die Kriterien der Sepsis. Das PCT stieg bei dieser Patientin im Verlauf der Sepsis (ein Tag nach Reanimation) auf max. 2,52 ng/ml an und fiel in den darauffolgenden Tagen kontinuierlich ab. Die A-SMase-Aktivität lag während der gesamten Sepsis im erhöhten Bereich der postoperativen Maximalwerte der Patienten ohne Sepsis oder mit SIRS-Kriterien mit einem Maximum an Tag 2 (3669 ± 207 pmol/ml*h).

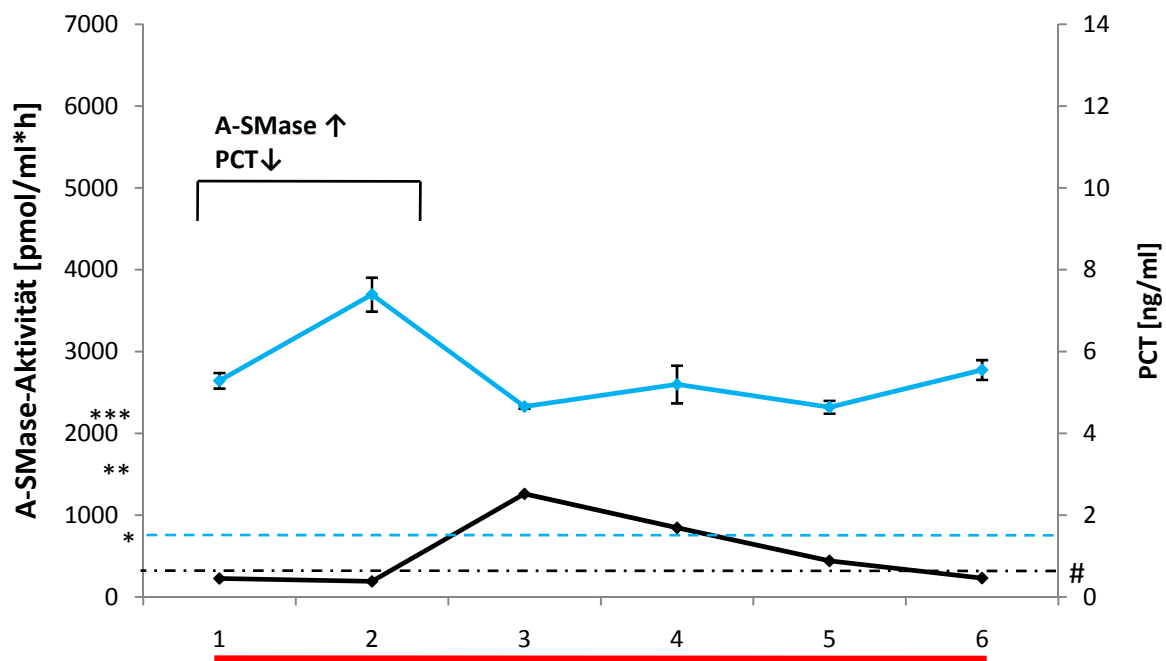


Abb. 14: ◆ A-SMase-Aktivität und ◆ PCT von Patient 5a der retrospektiven Studie; Sepsis von Tag 1-6; Tag 2: Reanimation)

Referenzwerte: # PCT (0,5 ng/ml) und A-SMase-Aktivität der Patienten ohne Sepsis und mit SIRS:

*Baseline, **1. postoperative Tag, ***Maxima der postoperativen Tag, — Sepsis

Patientin 8a (s. Abb. 15) entwickelte eine Sepsis bei Pneumonie und mehrfacher Leistenrevision bei infizierter ECMO (Extracorporeal Membrane Oxygenation), die aufgrund der ideopathischen Lungenfibrose (Typ UIP) intermittierend durchgeführt werden musste. Sekundär entwickelte sich ein hämodialysepflichtiges Nierenversagen. Die Patientin erfüllte die Kriterien einer Sepsis von Tag 1-6 ehe sie an den Komplikationen der Sepsis am 6. Tag verstarb. Die PCT-Werte lagen zu Studienbeginn nur leicht (Tag 1: 0,63 ng/ml, Tag 2: 0,55 ng/ml) über dem Referenzwert (0,5 ng/ml), stiegen jedoch an Tag 3 bis auf 59,73 ng/ml an. Die A-SMase-Aktivität lag bis auf Tag 4 während über dem Baselinewert, dem 1. postoperativen Tag und den Maxima des postoperativen Verlaufes der Patienten ohne Sepsis oder mit einer SIRS.

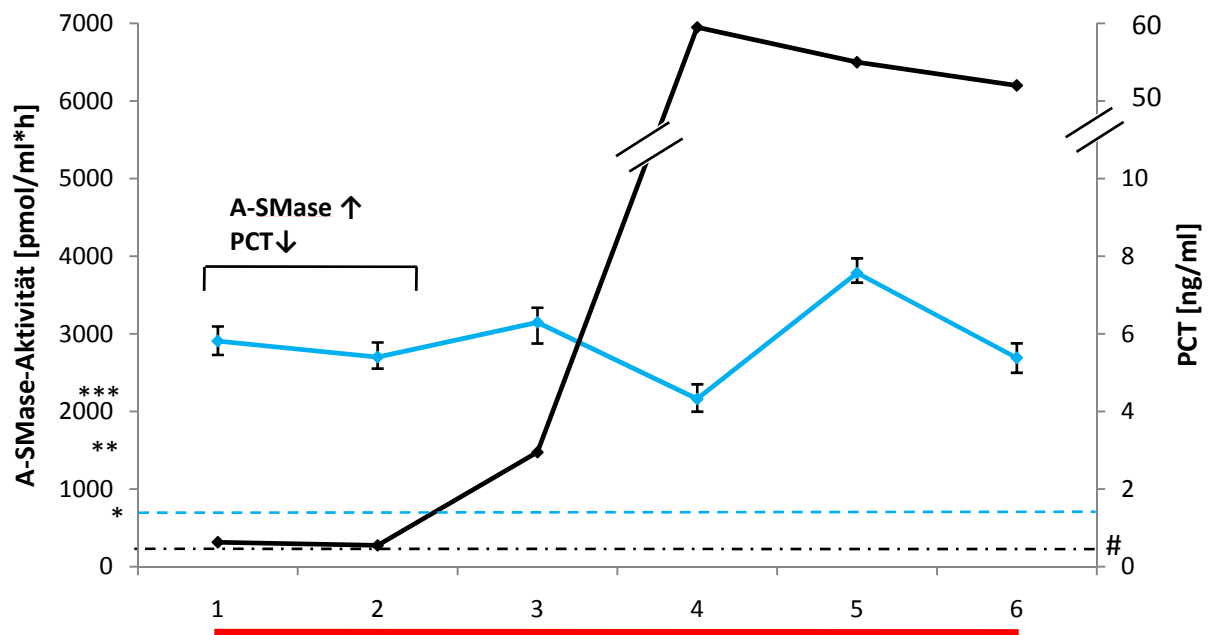


Abb. 15: ◆ A-SMase-Aktivität und ◆ PCT von Patient 8a der retrospektiven Studie; Sepsis von Tag 1-6; (ab Tag 4: zunehmend instabile Kreislaufparameter, Tag 6: verstorben)
Referenzwerte: # PCT (0,5 ng/ml) und A-SMase-Aktivität der Patienten ohne Sepsis und mit SIRS:
*Baseline, **1. postoperative Tag, ***Maxima der postoperativen Tage, — Sepsis

Patientin 12a (s. Abb. 16) entwickelte eine Sepsis bei einer Pneumonie mit positivem Aspergillus-Antigen-Nachweis. Dadurch kam es zu einer respiratorischen Insuffizienz und die Patientin musste intubiert werden. Neben dem hämodialysepflichtiges Nierenversagen benötigte die Patientin auf Grund einer Kreislaufinsuffizienz im Laufe der Sepsis Katecholamine. In der Vorgeschichte wurde außerdem eine Lebertransplantation (Lebendspende-Tochter) bei Cholangiozellulärem Karzinom durchgeführt. Sie erfüllte von 1-6 Tag die Sepsiskriterien. Das PCT war während innerhalb der Tage 1-3 nur leicht erhöht (0,5-0,79 ng/ml). Daraufhin stieg es an Tag 4 auf 27,29 ng/ml an. Die A-SMase-Aktivität lag im Gegenzug dazu im Zeitraum der gesamten 6 Tage über den Aktivitäten den Maxima der postoperativen Tage, dem ersten postoperativen Tages und der Baselinewert der Patienten aus der prospektiven Studie ohne Sepsis oder mit einer SIRS.

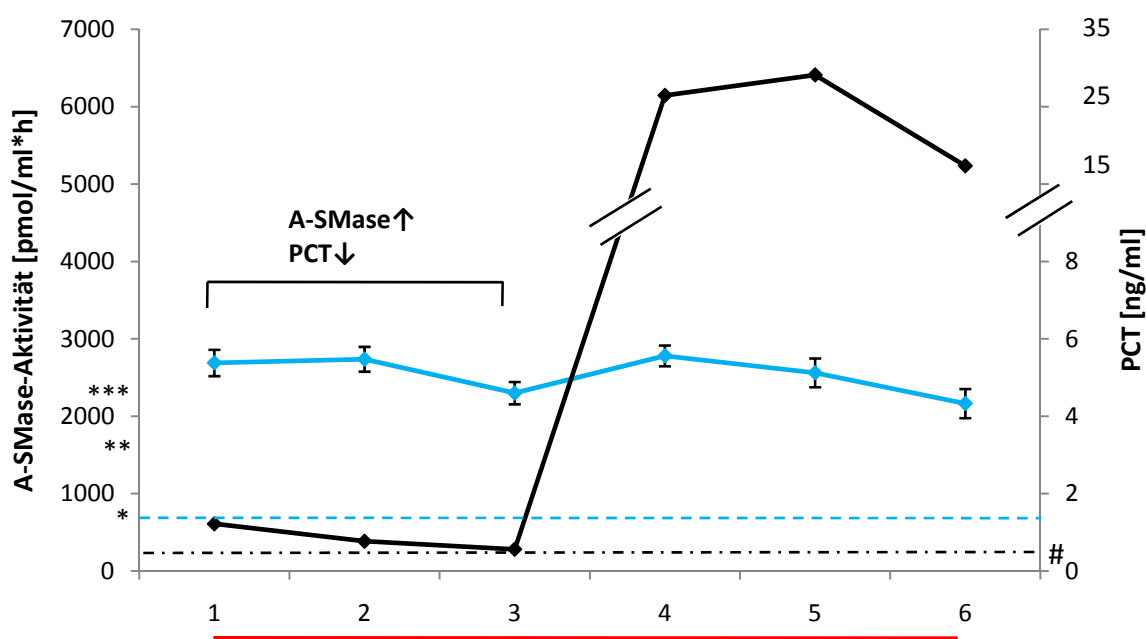


Abb. 16: ◆ A-SMase-Aktivität und ◆ PCT von Patient 12a der retrospektiven Studie; Sepsis von Tag 1-6

Referenzwerte: # PCT (0,5 ng/ml) und A-SMase-Aktivität der Patienten ohne Sepsis und mit SIRS:

*Baseline, **1. postoperative Tag, ***Maxima der postoperativen Tage, — Sepsis

Der Patient Nr. 13a (s. Abb. 17) entwickelte eine Sepsis im Rahmen einer schweren akuten Pankreatitis und dadurch ausgelösten Peritonitis. Im Verlauf der Erkrankung wurde der Patient mehrfach laparotomiert – Dünndarmteilresektion, Kolonresektion nach Hartmann, Nekrosektomie. Während der Sepsis entwickelte er sowohl sekundär ein hämodialysepflichtiges Nierenversagen als auch eine respiratorische Insuffizienz. An den Komplikationen der Sepsis verstarb er kurze Zeit nach den abgebildeten Parametern. An den Tagen 1-6 erfüllte er die Sepsiskriterien. Das PCT lag vor (Tag 1-3) dem Anstieg nur leicht über dem Referenzwert (0,5 ng/ml). An Tag 4 erhöhte sich das PCT auf 3,49 ng/ml. Im Gegensatz dazu lag die A-SMase-Aktivität während der gesamten 6 Tage über den Maxima des postoperativen Verlaufs der Patienten der prospektiven Studie ohne Sepsis oder mit einer SIRS.

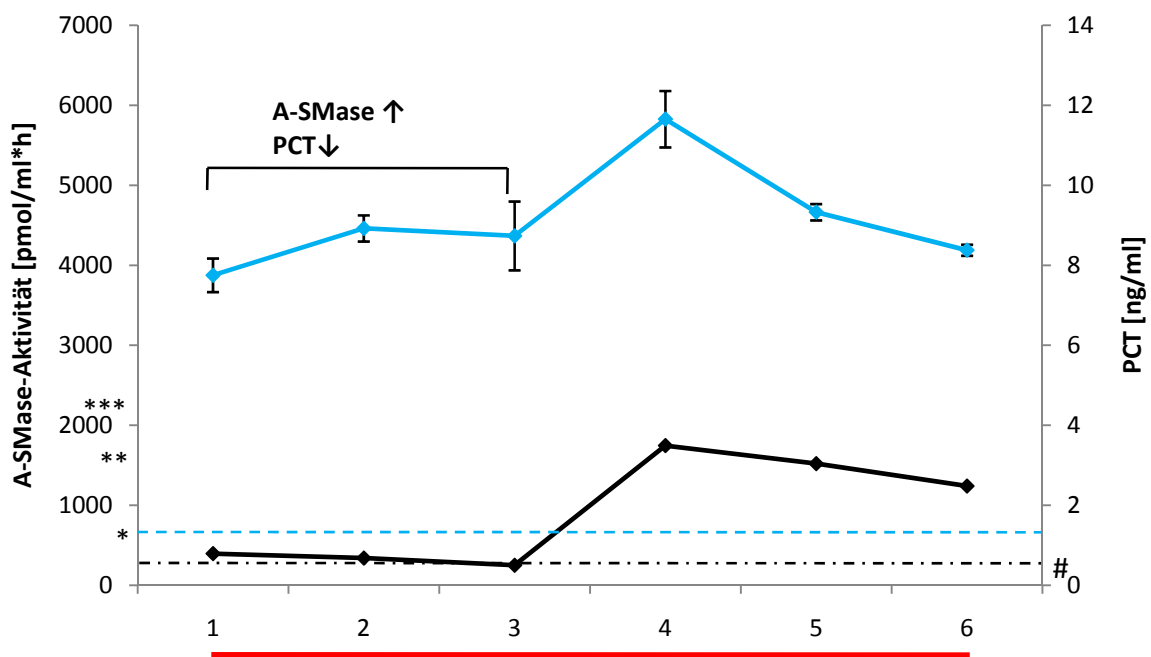


Abb. 17: ◆ A-SMase-Aktivität und ◆ PCT von Patient 13a der retrospektiven Studie; Sepsis von Tag 1-6;

Referenzwerte: # PCT (0,5 ng/ml) und A-SMase-Aktivität der Patienten ohne Sepsis und mit SIRS:

*Baseline, **1.postoperative Tag, ***Maxima der postoperativen Tage, — Sepsis

In der folgenden Tabelle 6 sind die Parameter (A-SMase-Aktivität und PCT) der Patienten der retrospektiven Studie aufgeführt. Mit Ausnahme von Patient 2a lagen die A-SMase-Aktivitäten der Patienten während der septischen Phase über denen der Patienten ohne Sepsis oder mit einer SIRS sowohl der Baselinewerte, dem 1. postoperativen Tag als auch der Maxima des postoperativen Verlaufes. Patient 2a erreichte dagegen lediglich A-SMase-Werte über dem Baselinewert, wobei das PCT bis auf 13,46 ng/dl anstieg.

Das PCT erreichte ebenfalls bei allen Patienten während der Sepsis erhöhte Werte. Bei Patient Nr. 4a, 5a, 12a als auch bei Patient Nr. 10 aus der prospektiven Studie lag das PCT <10 ng/ml. Im Gegensatz zu den anderen septischen Patienten lag bei diesen Patienten kein septischer Schock vor.

Tabelle. 6: PCT, A-SMase-Aktivität, Sepsisdauer der retrospektiven Studie (*PCT > 2ng/ml*)

Nr.	Sepsistage	Parameter	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
1a	1-6	PCT	181,54	363,93	254,31	113,23	39,53	27,67
		A-SMase-A.	5355	2078	1573	1621	1438	1070
2a	4-6	PCT	0,38	0,66	0,72	12,09	13,46	7,44
		A-SMase-A.	567	1237	1104	1200	1355	701
4a	4-6	PCT	0,22	0,36	0,31	2,23	3,77	5,97
		A-SMase-A.	3611	4469	3494	5853	5467	4991
5a	1-6	PCT	0,45	0,38	2,52	1,69	0,88	0,46
		A-SMase-A.	2642	3696	2326	2598	2319	2775
6a	2-6	PCT	2,27	4,37	13,92	11,7	9,91	5,75
		A-SMase-A.	2073	2432	4103	2850	2762	2754
8a	1-6	PCT	0,63	0,55	2,95	59,75	57,78	52,43
		A-SMase-A.	2906	2700	3147	2160	3784	2689
11a	1-3	PCT	6,79	35	25,99			
		A-SMase-A.	5467	4815	4967			
12a	1-6	PCT	1,22	0,77	0,56	27,29	28,82	15,97
		A-SMase-A.	2689	2373	2299	2780	2561	2164
13a	1-6	PCT	0,79	0,68	0,5	3,49	3,04	2,48
		A-SMase-A.	3875	4461	4367	5827	4664	4118

4. Diskussion

Die schwere Sepsis und der septische Schock haben mit 55% eine sehr hohe Letalität und stellen mit 75 000 Todesfällen pro Jahr die dritthäufigste Todesursache in Deutschland dar (Engel et al. 2007). Sowohl die späte Diagnose als auch die zu spät eingeleitete antimikrobielle Therapie verursachen im Wesentlichen diese hohe Letalität. In diesem Zusammenhang konnte Kumar et al. (2006) in ihrer Studie zeigen, dass die Hospitalsterblichkeit von Patienten mit septischem Schock mit jeder Stunde einer verspäteten Antibiotikagabe um 7% zunahm. Die gezielte Antibiotikatherapie sollte, nach neusten Empfehlungen der Deutschen-Sepsis-Gesellschaft, innerhalb von einer Stunde nach Beginn der schweren Sepsis oder des septischen Schocks initiiert werden (Reinhart 2005).

Die frühe Diagnosestellung der Sepsis ist nach wie vor problematisch, da es keinen angemessenen Marker gibt, der den Übergang einer lokalen Infektion zur systemischen Sepsis sicher vorhersagen kann. Das PCT ist nach den S2-Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft momentan der einzige diagnostische Marker, der die Kriterien der Evidenzbasierten Medizin erfüllt.

In der vorliegenden klinisch-experimentellen Arbeit wurde die A-SMase-Aktivität im Vergleich zu etablierten Markern PCT und CRP in einer großen Zahl an abdominalchirurgischen Patienten sowie septischen Patienten und einer Kontrollgruppe untersucht. Die Auswertung der postoperativen Verläufe in diversen Einzelfallbeschreibungen ergab neben der deutlich erhöhten A-SMase-Aktivität während der Sepsis, eine frühzeitig erhöhte A-SMase-Aktivität vor bzw. während der Sepsis im Vergleich zum PCT und CRP. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die saure Sphingomyelinase als zusätzlicher früher und spezifischer Sepsismarker geeignet ist.

Für die exakte Interpretation der A-SMase-Aktivität im Serum der Patienten ist wichtig zu wissen, welche andere mögliche Faktoren auf die A-SMase-Aktivität wirken. Um mögliche Induktoren neben der Sepsis zu identifizieren, wurde der Einfluss von Tumorerkrankungen und von Operationstraumata auf die A-SMase im Plasma im Rahmen dieser Arbeit diskutiert.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein postoperativ initial hoher PCT-Wert positiv prädiktiv für postoperativen entstehende infektiöse Komplikation sein kann.

4.1 Tumorerkrankung und die Aktivität der A-SMase

Bei dem in dieser Studie zugrundeliegenden Patientenkollektiv handelt es sich um Patienten mit einer Tumorerkrankung. Tumore zeichnen sich durch unkontrollierte Zellproliferation aus, bei denen Zellen häufig nicht in der Lage sind, in die Apoptose einzutreten. In der Regel liegt bei diesen Zellen eine Mutation vor, durch die die Zellen in der Lage sind, sich dem Apoptosesignal zu entziehen. In dieser Signalkaskade spielen die Ceramide als Signalmoleküle und damit die Sphingomyelinase-Aktivität eine wichtige Rolle. In einigen Tumoren, z. B. Gliomen und Kolonkarzinomen, konnten signifikant veränderte Ceramidspiegel gemessen werden. Es gibt Hinweise darauf, dass die herabgesetzten Ceramidspiegel in bestimmten Tumoren durch eine Reduktion der A-SMase-Aktivität verursacht werden (Smith und Schuchmann 2008). Außerdem wurde gezeigt, dass im Rahmen einiger antionkologischer Therapien die A-SMase wichtig für die Antwort der Zelle auf die Behandlung ist (Lacour et al. 2004). Dazu konnte erst kürzlich Grammatikos et al. (2007) in einer Studie zeigen, dass es durch eine Transfektion von Tumorzellen mit der A-SMase zu einer Sensibilisierung gegenüber bestimmten Chemotherapeutika kommt. Dadurch wurde die Wirkung der Chemotherapie deutlich verstärkt.

Als ein Nebenaspekt der vorliegenden Arbeit konnte mittels der prospektiv untersuchten Patienten der Einfluss einer Tumorerkrankung auf die A-SMase-Aktivität im Serum untersucht werden. Dazu wurde das Patientenkollektiv mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Bei diesem Vergleich ergab sich kein signifikanter Unterschied der A-SMase-Aktivität im Serum zwischen den beiden Gruppen.

In Kolonkarzinomzellen konnte Selzner et al. (2001) niedrigere Spiegel von Ceramiden nachweisen, was für die geringe Enzymaktivität der A-SMase-Aktivität spricht. Da die A-SMase-Aktivität in der vorliegenden Arbeit extrazellulär im Plasma gemessen wurde, deutet sich damit an, dass nur die intrazelluläre A-SMase-Aktivität der Zelle, nicht jedoch die extrazellulär sezernierte A-SMase-Aktivität verändert ist. Man kann also vorsichtig schlussfolgern, dass die A-SMase-Aktivität im Plasma keinen Einfluss über den Ceramidstoffwechsel auf die Apoptosereduktion in Kolonkarzinomen zu haben scheint.

4.2 PCT-Spiegel und A-SMase-Aktivität als prognostischer Marker der Sepsis

Seit längerer Zeit ist bekannt, dass das Operationstrauma in Abhängigkeit von der Art und des Ausmaßes des chirurgischen Eingriffs ein Stimulus für den Anstieg der Plasmakonzentration von PCT und CRP ist (Meissner 2000). Steril-chirurgisch versorgte Wunden stellen keinen Stimulus für die Induktion des PCTs dar, wohingegen große abdominale Eingriffe zum Anstieg führen können. Nach Meissner (2000) führen kleine Eingriffe (Leistenhernie, Totalendoprothese der Hüfte, Thyreodektomie, periphere Gefäßchirurgie) zu leichten PCT-Erhöhungen ($< 0,5\text{-}1\text{ ng/ml}$) und deutlichen CRP Anstiegen ($30\text{-}190\text{ mg/l}$). Große abdominal-chirurgische Eingriffe führten dagegen zu moderaten PCT- ($0,6\text{-}1,3\text{ ng/ml}$) und deutlichen CRP-Anstiegen ($80\text{-}250\text{ mg/l}$). Der Bereich von über 2 ng/ml wird jedoch nur selten überschritten (Meisner 2000).

Bezüglich der postoperativen PCT- und CRP-Werte der Patienten ohne Sepsis oder mit SIRS bestätigten sich in der vorliegenden Arbeit die bereits schon bekannten Ergebnisse. Jeder Patient (keine Sepsis/SIRS) hatte einen postoperativen Anstieg über den Referenzwert $< 0,5\text{ ng/ml}$ wobei nur 2 der 26 Patienten (7,7%) PCT-Konzentrationen über 2 ng/ml erreichten. Bei allen Operationen handelte es sich um große abdominal-chirurgische Eingriffe, auch wenn sich Art und Umfang der jeweiligen Operationen in einigen Patienten in Abhängigkeit der Grunderkrankung doch deutlich unterschied. Dadurch war die Einteilung in verschiedene Gruppen sehr schwierig und die Fallzahlen in den einzelnen Gruppen zu gering, um eine aussagekräftige, statistische Auswertung durchführen zu können.

Eine Abhängigkeit gegenüber der Operationsart konnte mit der von uns ausgewählten Einteilung sowohl für PCT als auch für die A-SMase-Aktivität in diesem Zusammenhang statistisch nicht festgestellt werden (s. Abb. 3, S. 26). Hierbei zeigte sich z.B., dass eine Whipple-Operation den gleichen Streubereich der A-SMase-Werte erreichte wie eine Gastrektomie oder Ösophagektomie. Nur die Patienten mit einer Darmresektion oder Resektion eines Analkarzinoms erreichten im Mittelwert PCT-Werte $> 2\text{ ng/ml}$. Die genaue Ursache für diese postoperativ erhöhten PCT-Werte ist jedoch nicht geklärt. Möglicherweise scheint eine vorübergehende intraoperative Kontamination mit Bakterien oder eine Endotoxinfreisetzung durch die Präparation der Intestinalanastomose den Anstieg zu verursachen. Die Bildung proinflammatorischer Zytokine wie z. B. $\text{TNF-}\alpha$ oder IL-6 als Stimulus ist nur nach

größeren Operationstraumen beschrieben (Kristiansson et al. 1993) und könnte dieses Ergebnis erklären. Um die genauen Ursache des postoperativen PCT-Anstiegs zu bestätigen, müssen in diesem Zusammenhang noch weiterführende Studien durchgeführt werden.

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich, dass das PCT möglicherweise positiv prädiktiv ist im Hinblick auf das Risiko, eine postoperative infektiöse Komplikation zu entwickeln. Interessanterweise lagen die PCT-Werte bei den Patienten mit der Komplikation Sepsis bereits am 1. postoperativen Tag höher als bei Patienten ohne septische Komplikation. Bei 11 von 12 der Sepsispatienten lag der sog. cut-off Wert des PCT bei > 2 ng/ml. Lediglich 2 der 26 Patienten (7,7%) ohne septische Komplikation oder mit SIRS im postoperativen Verlauf zeigten PCT-Spiegel > 2 ng/ml. In einigen Studien wurde der PCT-Wert bereits als möglicher Prädiktor für postoperative Komplikationen behandelt (Reith et al. 1998, Novotny et al. 2007). Reith et al. (1998) deuteten in seiner Studie bereits an, dass ein deutlich erhöhtes PCT an den ersten beiden postoperativen Tagen als Prädiktor für die Komplikation einer Sepsis sein könnte. Novotny et al. (2007) stellte mittels des PCTs zu Beginn der Sepsis und dem APACHE II-Score eine Funktion zur Berechnung der Letalitätsrisiko auf. Für die korrekte Interpretation muss jedoch auch die Art und das Ausmaß einer vorangegangenen Operation als möglicher Einflussfaktor berücksichtigt werden (Meisner 2000).

Neben dem Einfluss auf das PCT konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Operationstrauma auch einen Einfluss auf die A-SMase-Aktivität hat. Im Plasma jedes Patienten wurden erhöhte Aktivitäten der A-SMase am ersten postoperativen Tag gemessen. Jeder Patient verzeichnete einen Anstieg zu seinem Ausgangswert (s. Abb. 4, S. 28). Postoperativ fanden sich persistierend hohe A-SMase-Aktivitäten bei den Patienten, die im Verlauf eine Sepsis als Komplikation entwickelten. Dazu wird im nächsten Abschnitt der Einzelfalldarstellungen der septischen Patienten und der postoperativen Verläufe näher eingegangen.

Der Stimulus des Anstiegs der A-SMase-Aktivität könnte, ähnlich wie für das PCT nach großen Eingriffen beschrieben, intraoperativ-freigesetzte proinflammatorische Zytokine sein. Schütze et al. (1992) konnten diesbezüglich schon früh zeigen, dass die A-SMase-Aktivität durch $\text{TNF-}\alpha$ induziert werden kann und prinzipiell zu einem

postoperativen A-SMase-Aktivitäts-Anstieg führen könnte. Buttenschoen et al. (2008) hatten in einer Studie nachgewiesen, dass die Zytokine TNF- α und IL-6 postoperativ innerhalb eines Zeitfensters von 2 Tagen wieder abfallen und so als Stimulus nicht mehr zu Verfügung stehen können. In dieser Arbeit kam es jedoch bei einigen Patienten erst außerhalb des Zeitfensters von 2 Tage zu dem maximalen Anstieg der A-SMase-Aktivität während des postoperativen Verlaufes. Die genaue Ursache für den A-SMase-Anstieg hierzu konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

4.3 Kinetik der PCT-Spiegel und der A-SMase-Aktivitäten während der Sepsis

In vielen vorherigen Studien wurden verschiedene Laborparameter als Sepsismarker kontrovers diskutiert. Derzeit ist das PCT, nach den S-2 Leitlinien der Deutschen Sepsis Gesellschaft, der einzige adäquate Sepsismarker. Nach einer infektiös bedingten Entzündungsreaktion kommt es neben dem PCT auch zu erhöhten Blutspiegeln der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und der Akute-Phase-Proteine wie dem CRP. Trotz des frühzeitigen Anstiegs der Zytokin-Spiegel im Verlauf eines Entzündungsprozesses bleibt das PCT der bisher verlässlichste diagnostische Marker, da es eine wesentlich längere Halbwertszeit besitzt, einen ausgeprägteren Anstieg als die Zytokine aufweist und spezifisch mit dem Schweregrad der Sepsis korreliert (Meisner 2000, Brunkhorst et al. 2000).

In der vorliegenden Studie konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Bei allen Patienten mit Sepsis bzw. septischem Schock lagen die PCT-Werte über dem Referenzwert 0,5 ng/ml. 11 der 12 Patienten erreichten Werte von > 2 ng/ml, ein Wert bei dem eine Sepsis sehr wahrscheinlich ist. Außerdem korrelierte der Schweregrad der Sepsis mit der Höhe des PCT-Wertes. Während bei den 4 septischen Patienten ohne klinische Zeichen eines septischen Schocks das PCT < 10 ng/ml lag, betrug der PCT-Spiegel > 10 ng/ml bei 7 von 8 Patienten mit septischem Schock.

Die Kinetik des PCT-Anstiegs erfolgte nach Literaturanlagen zwar nach der Kinetik der Zytokinen, hat dabei jedoch den Vorteil, dass der Anstieg früher beginnt als beispielsweise das CRP und eindeutiger mit dem Schweregrad des Krankheitsbildes korreliert. Das CRP ist bisher der häufigste allgemein verwendete Marker einer

Entzündung. Es ist jedoch inzwischen akzeptiert, dass das CRP weder in der Frühdiagnostik noch in der Schweregradbeurteilung des Sepsisverlaufs eine Bedeutung hat (Silvestre et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit fand sich sowohl ein verspäteter Anstieg des CRPs nach dem Operationstrauma als auch während der Sepsis. Dabei führte neben dem verspäteten Anstieg weder die Art der Operation noch die Sepsis zu einem signifikanten Unterschied in der Höhe der CRP-Werte. Weder eine adäquate Diagnostik noch eine Schweregradbeurteilung der Sepsis konnte also mit Hilfe des CRPs gewährleistet werden.

In Bezug auf die Enzymaktivität der A-SMase konnten Drobnik et al. (2003) und Claus et al. (2005) bereits veränderte A-SMase-Aktivitäten beobachten. So wies Drobnik et al. (2003) an einem Patientenkollektiv von 102 septischen Patienten gegenüber einem gesunden Kontrollkollektiv ein erhöhtes Ceramid / Sphingomyelin-Verhältnis nach. Die Ceramidspiegel wurden jedoch an 3 willkürlich festgelegten Tagen bei Erfüllung der definierten Sepsiskriterien bestimmt. Claus et al. (2005) konnten retrospektiv einer kleinen Zahl von 12 septischen Patienten, verglichen mit einer Kontrollgruppe von 13 Probanden, eine erhöhte Sphingomyelinase-Aktivität im Plasma nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurden im Gegensatz zu den publizierten Daten die Verläufe der A-SMase-Aktivität sowohl vor als während der septischen Phase bestimmt. Dabei konnten bei 11 von 12 septischen Patienten ebenfalls erhöhte A-SMase-Aktivitäten nachgewiesen werden. Patient Nr. 10 erfüllte die Sepsiskriterien bereits am 2. postoperativen Tag, jedoch fanden sich einzig bei diesem Patienten keine erhöhten A-SMase-Aktivitäten. Eine mögliche Erklärung scheint die fehlende hämodynamische Instabilität als auch der fehlende Nachweis der Infektion zu sein. Die übrigen 11 septischen Patienten hatten im Vergleich zu den Baselinewerten aller operierten Patienten deutlich erhöhte A-SMase (Sensitivität: 83% und Spezifität: 100%).

Als besonderes Merkmal der vorliegenden Studie konnte bei den 3 septischen Patienten der prospektiven Beobachtungsstudie erstmals ein intraindividueller Vergleich von A-SMase-Aktivität durchgeführt werden, da die präoperativ durchgeführten Blutentnahmen und jeweilige Analyse der A-SMase-Werte als interne Bezugswerte dieser Patienten vorlagen.

Die A-SMase-Aktivität stieg bei allen 3 Patienten signifikant während der Sepsis im Vergleich zum präoperativen A-SMase-Wert an. Diese Ergebnisse bestätigen den in der Literatur beschriebenen Anstieg der A-SMase Aktivität während einer Sepsis und weisen somit auf eine mögliche Rolle dieses Enzyms in der Pathogenese hin der Sepsis.

Zusätzlich zum quantitativen Anstieg der A-SMase-Aktivität im Rahmen einer Sepsis scheint eine Korrelation zwischen der Höhe der A-SMase-Aktivität und der Überlebenswahrscheinlichkeit zu bestehen (Drobnik et al. 2003, Claus et al. 2005). In beiden Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl die A-SMase als auch das Ceramid/Sphingomyelin-Verhältnis bei den Patienten, die nicht überlebten (Drobnik et al.: n=19, Claus et al.: n=7), im deutlich höheren Bereich lagen, als die Patienten, welche die septische Phase überlebten.

Auch in der vorliegenden Studie wiesen 3 der 4 verstorbenen septischen Patienten die höchsten A-SMase-Aktivitäten ($> 5000 \text{ pmol/ml}\cdot\text{h}$) auf. Trotz der geringen Patientenzahl scheint sich auch hier die Korrelation zwischen Höhe der Enzymaktivität und dem klinischem „Outcome“ widerzuspiegeln. Diese Hypothese gilt es in einer nachfolgenden größeren Studie zu bestätigen.

Die Ursache für den Anstieg der A-SMase-Aktivitäten im Rahmen des komplexen Krankheitsbildes der Sepsis ist bislang nicht geklärt. Verschiedene Mechanismen der A-SMase-Aktivierung könnten nach Lage der Literatur in Frage kommen. Sowohl die Freisetzung von Zytokinen als auch der oxidative Stress während der Sepsis könnten einen Einfluss auf die A-SMase-Spiegel haben. Reaktive Sauerstoffspezien (reactive oxygen species, ROS) sind in die Immunpathophysiologie der Sepsis involviert (Cohen 2002). Außerdem ist bekannt, dass ROS die Aktivität katalytischer Enzyme verändern können. Einige Studien belegten, dass die A-SMase durch ROS induziert wird. Durch die Behandlung mit Antioxidantien konnte die A-SMase reduziert werden. Dumitru et al. (2006) konnten mittels der Antioxidanzien N-Acetylcystein und Trion die TRAIL-induzierte A-SMase-Aktivierung senken. Dies führte zu sinkenden Ceramidspiegeln und damit verbundenen reduzierten Apoptoseraten.

Neben den ROS spielen auch Zytokine eine wichtige Rolle in der Induktion der A-SMase bei der Sepsis. Sowohl die A-SMase als auch das PCT im Plasma steigen

nach Injektion von Lipopolysacharid (LPS) an und können auch durch TNF- α und IL-1 stimuliert werden (Wong et al. 2000, Linscheid et al. 2004). LPS bildet zusammen mit Phospholipiden und Proteinen die äußere Membran gramnegativer Bakterien. LPS kann, neben vielen weiteren Faktoren wie z.B. Superantigen, ein Auslösefaktor für die immunologische Kaskade der Sepsis sein. Zum Zeitpunkt der Aktivierung Endotoxin-sensibler Zellen werden Zytokine (TNF- α IL-1, IL-6 etc.) freigesetzt, die ihrerseits wieder die A-SMase aktivieren können. Eine Translokation der A-SMase vom Zellinnern an die Plasmamembran wurde nach Stimulation der CD95 und TRAIL-Rezeptoren beobachtet (Dumitru et al. 2006). Im Modell der perfundierten Ratten und Mäuselungen wurde von Göggel et al. (2003) gezeigt, dass die A-SMase nach Zugabe von PAF sowie von Säure-Instillation sezerniert wird.

PCT wird ebenfalls durch Zytokine und LPS induziert. Es ist nach 2h in kleinen Mengen nach Zytokin-Stimulierung von Makrophagen nachweisbar. Diese Sekretion ist begrenzt und stellt den Auslöser für die daraufhin folgende Synthese von PCT durch das parenchymatische Gewebe dar, da es nach > 18h zu extremen Konzentrationen von PCT gegenüber physiologischen Konzentrationen kommt (Linscheidt et al. 2004). Wong et al. (2000) zeigten dagegen, dass die A-SMase durch LPS, TNF- α , IL-1 schon nach 3h zu einer 2-3-fachen Zunahme der A-SMase-Aktivität. Dies spricht für einen durch Zytokine induzierten frühen Anstieg der A-SMase-Aktivität. Dieses kurze Zeitfenster konnte mit der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden, da keine Zytokinspiegel bestimmt wurden. Interessanterweise stellte sich in der vorliegenden Arbeit jedoch in Einzelfällen septischer Patienten der retrospektiven Studie (Patienten 4a, 5a, 8a, 12a, 13a) heraus, dass die A-SMase-Aktivität bereits 2-3 Tage vor dem PCT deutlich erhöht war.

Auch die Analyse der postoperativen Verläufe der septischen Patienten der prospektiven Beobachtungsstudie zeigte eine frühere Aktivierung der A-SMase als das PCT. Sowohl bei Patient Nr. 12 als auch Nr. 26 wurden trotz rückläufigem PCT persistierend erhöhte A-SMase-Aktivitäten innerhalb der ersten 5 postoperativen Tage gemessen. Bei Patient Nr. 26 reproduzierte sich die frühzeitige Aktivierung nochmals vor Beginn der zweiten Sepsisepisode. Bei einem rückläufigen PCT stieg die A-SMase an bzw. persistierte auf erhöhtem Niveau (s. Abb. 10 und 11, S. 40/41).

Zusammengenommen könnten diese Ergebnisse als Indiz für die A-SMase als früher Marker bzw. positiver Prädiktor für eine infektiöse Komplikation gewertet werden.

Der genaue Beginn des Anstieges der A-SMase-Aktivität konnte in dieser Arbeit leider nicht bestimmt werden, da in der prospektiven Studie zwischen dem postoperativen Verlauf und der septischen Phase z. T. größere Zeitintervalle lagen, in denen keine Proben entnommen wurden, da der Sepsisbeginn außerhalb des geplanten Studienintervalls lag. Jedoch deutet sich auch hier zum Teil ein früherer Anstieg der A-SMase als bei dem PCT an. Bei Bestätigung dieser ersten Ergebnisse durch weitere Folgestudien könnte die Bestimmung der A-SMase aus dem Serum chirurgischer Patienten eventuell einen entscheidenden Beitrag zur frühen Diagnostik der Sepsis leisten. Sollte sich die funktionelle Kausalität zwischen Freisetzung und Aktivierung der A-SMase im Serum zur Schwere der post-OP-Verläufe zeigen lassen, wäre eventuell sogar eine klinisch relevante Therapie im Sinne der Hemmung der A-SMase denkbar.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Eine wesentliche Ursache für die hohe Letalität der Sepsis ist die späte Diagnose mit dadurch bedingter Verzögerung einer gezielten antimikrobiellen Therapie. Das PCT stellt momentan den einzigen, auf Evidenzbasierender Medizin beruhenden Sepsismarker dar. In einigen vorherigen Studien deutete sich an, dass die A-SMase ein wichtiger neuer Faktor im immunpathologischen Bild der Sepsis sein könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde in Verlaufsstudien deshalb näher untersucht, ob die A-SMase als möglicher Sepsismarker in Frage kommen könnte, um eine frühere Diagnostik und Therapie zu erreichen. Dazu wurden die Enzymaktivitäten der A-SMase im Serum der Patienten vor bzw. während der Sepsis analysiert und mit dem PCT und dem CRP verglichen. Während der Sepsis konnten erhöhte A-SMase-Aktivitäten gemessen werden und es deutete sich entweder ein früherer Anstieg oder eine erhöhte Enzymaktivität vor dem Anstieg des bisher eingesetzten Sepsismarkers PCT an.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass neben dem Stimulus durch eine Infektion, auch das Operationstrauma zu einem Anstieg der A-SMase-Aktivität führen kann. Die A-SMase-Aktivität stieg bei allen Patienten bereits am ersten postoperativen Tag signifikant an. Der genaue Stimulus für den postoperativen Anstieg konnte jedoch noch nicht aufgeklärt werden. Der Einfluss einer Tumorerkrankung (28 der 29 prospektiv untersuchten Patienten hatten einen Tumor des Gastrointestinaltrakts) auf die sekretorische A-SMase-Aktivität konnte in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe ausgeschlossen werden.

Darüber hinaus stellte sich in dieser Studie heraus, dass PCT-Werte > 2 ng/ml am ersten postoperativen Tag positiv prädiktiv für die Entwicklung einer postoperative infektiösen Komplikation zu sein scheinen. Das Operationstrauma führte bei allen Patienten zu einem Anstieg der PCT-Werte.

Als wichtigstes Ergebnis dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die A-SMase während der Sepsis deutlich erhöhte Werte erreichte und dass im Vergleich zum PCT und CRP in mehreren Fällen sogar eine deutlich früher erhöhte Aktivität der A-SMase direkt vor bzw. während der Sepsis nachweisbar war. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die A-SMase-Aktivität in der Tat als Laborparameter eine

septische Komplikation früher diskriminiert als das PCT und CRP. Es zeigte sich auch eine Korrelation zwischen der Höhe des Anstiegs und der Überlebenswahrscheinlichkeit septischer Patienten: 4 der 5 an einer Sepsis verstorbenen Patienten erreichten die höchsten A-SMase-Aktivitäten in dem vorliegenden Patientenkollektiv. Aufgrund der geringen Fallzahl kann dieses Ergebnis jedoch lediglich als Hypothesen-generierend angesehen werden, welches in einer weiterführenden größeren Studie verifiziert werden muss.

In der weiteren Perspektive sollte neben der Aufklärung der molekularen Mechanismen der A-SMase-Aktivierung während der Sepsis in tierexperimentellen Ansätzen weiterhin geprüft werden, ob eine Hemmung der A-SMase-Aktivität einen Einfluss auf den Verlauf einer Sepsis haben könnte. Diese Untersuchungen könnten die Frage beantworten, ob die A-SMase nicht nur einen diagnostischen, sondern auch einen therapeutischen Stellenwert in der Sepsis hat.

6. Literaturverzeichnis

Agha, A., Bein, T., Fröhlich, D., Höfler, S., Krenz, D., Jauch, K.-W. (2002): "Simplified Acute Physiology Score" (SAPS II) zur Einschätzung der Erkrankungsschwere bei chirurgischen Intensivpatienten. *Der Chirurg* 73, 439-442

Alberti, C., Brun-Buisson, C., Burchardi, H., Martin, C., Goodman, S., Artigas, A., Sicignano, A., Palazzo, M., Moreno, R., Boulmé, R., Lepage, E., Le Gall, R. (2002): Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med.* 28, 108-121

Bates, D.W., Cook, E.F., Goldman, L., Lee, T.H. (1990): Predicting bacteremia in hospitalized patients. A prospectively validated model. *Ann. Intern. Med.* 113, 495-500

Bates, D.W., Sands, K., Miller, E., Lanken, P.N., Hibberd, P.L., Graman, P.S., Schwartz, J.S., Kahn, K., Snyderman, D.R., Parsonnet, J., Moore, R., Black, E., Johnson, B.L., Jha, A., Platt, R. (1997): Predicting bacteremia in patients with sepsis syndrome. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. *J. Infect. Dis.* 176, 1538-1551

Baumruker, T., Prieschl, E.E. (2002): Sphingolipids and the regulation of the immune response. *Immunology* 14, 57-63

Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-907

Brady, R.O., Kanfer, J.N., Mock, M.B., and Fredrickson, D.S. (1966): The metabolism of Sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 55, 366-369

Brunkhorst, F.M., Wegscheider, K., Forycki, Z.F., Brunkhorst, R. (2000): Procalcitonin for early diagnosis and differentiation of SIRS, sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Intensive Care Med.* 26, 148-152

Buttenschoen, K., Schneider, M.E., Utz, K., Kornmann, M., Beger, H.G., Buttenschoen, D.C. (2008): Effect of major abdominal surgery on endotoxin release and expression of Toll-like receptor 2. *Langenbeck Arch. Surg.* 394, 293-302

Cohen, J. (2002): The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420, 885-891

Christ-Crain, M, Müller, B. (2005): Procalcitonin in bacterial infections-hype, hope more or less? *Swiss Medical Weekly* 135, 451-460

Claus, R.A., Bunck, A.C., Bockmeyer, C.L., Brunkhorst, F.M., Lösche, W., Kinscherf, R., Deigner, H.P. (2005): Role of increased sphingomyelinase activity in apoptosis and organ failure of patients with severe sepsis. *FASEB J.* 19, 1719-1721

Crowe, M., Ispahani, P., Humphreys, H., Kelley, T., Winter, R. (1998): Bacteraemia in the adult intensive care unit of a teaching hospital in Nottingham, UK, 1985-1996. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17, 377-384

Dellinger, R.P., Carlet J., Massur, H., Gerlach, H., Calandra, T., Cohen, J., Gea-Banacloche, J., Keh, D., Marshall, J.C., Parker, M.M., Ramsay, G., Zimmerman, J.L., Vincent, J.L., Levy, M.M. (2004): Surviving Sepsis Campaign for management of severe sepsis and septic shock. *Crit. Care Med.* 32, 858-872

Drobnik, W., Liebisch, G., Audebert, F.X., Frohlich, D., Gluck, T., Vogel, P., Rothe, G., Schmitz, G. (2003): Plasma ceramide and lysophosphatidylcholine inversely correlate with mortality in sepsis patients. *J. Lipid Res.* 44, 754-761

Dörner, K. (2006): *Klinische Chemie und Hämatologie*. 6. Überarbeitet Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart / New York

Dumitru, C.A., Gulbins, E. (2006): TRAIL activates acid sphingomyelinase via a redox mechanism and release ceramide to trigger apoptosis. *Oncogene* 25, 5612-5625

Engel, C., Brunkhorst, F.M., Bone, H.-G., Brunkhorst, R., Gerlach, H., Grond, S., Gruendling, M., Huhle, G., Jaschinski, U., John, S., Mayer, K., Oppert, M., Olthoff, D., Quintel, M., Ragaller, M., Rossaint, R., Stuber, F., Weiler, N., Welte, T., Bogatsch, H., Hartog, C., Loeffler, M., Reinhart, K. (2007): Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med.* 33, 606-618

Garner, J.S., Jarvis, W.R., Emori, T.G., Horan, T.C., Hughes, J.M. (1998): CDC definitions for nosocomial infections. *Am. J. Infect. Control.* 16, 128-140

Grammatikos, G., Teichgräber, V., Carpinteiro, A., Trarbach, T., Weller, M., Hengge U.R., Gulbins, E. (2007): Overexpression of Acid Sphingomyelinase sensitizes glioma cells to chemotherapy. *Antioxidants & Redox Signaling* 9, 1449-1456

Göggel, R., Winoto-Morbach, S., Vielhaber, G., Yumiko, I., Lindner, K., Brade, L., Brade, H., Ehlers, S., Slutsky, A.S., Schütze, S., Gulbins, E., Uhlig, S. (2003): PAF-mediated pulmonary edema: a new role for acid sphingomyelinase and Ceramide. *Nature Medicine* 10, 155-160

Harbarth, S., Holeckova, K., Froidevaux, C., Pittet, D., Ricou, B., Grau, G.E., Vadas, L., Pugin, J. and the Geneva Sepsis Network (2001): Diagnostic Value of Procalcitonin, Interleukin-6 and Interleukin-8 in Critically Ill Patients Admitted with Suspected Sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164, 396-402

Hoffmann J.A., Kafatos F.C., Janeway C.A., Ezekowitz R.A.B. (1999): Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 248, 1313-1318

Hotchkiss, R.S., Karl, I.E. (2003): The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med.* 348, 138-150

Jenkins, R.W., Canals, D., Hannun, Y.A. (2009): Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cellular Signaling* 21, 836-846

Knaus, W.A., Draper, E.A., Wagner, D.P., Zimmermann, J.E. (1985): APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit. Care Med.* 13, 818-829

Kristiansson, M., Saraste, L., Sundqvist, K.G. (1993): Post-operative circulating patterns the influence of infection. *Intensive Care Med.* 7, 395-400

Kumar, A., Roberts, D., Wood, K.E., Light, B., Parrillo, J.E., Sharma, S., Suppes, R., Feinstein, D., Zanotti, S., Taiberg, L., Gurk, D., Kumar, A., Cheang, M. (2006): Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock, *Crit. Care Med.* 34, 1589-1596

Lacour, S., Hammann, A., Grazide, S., Lagadic-Gossmann, D., Athias, A., Sergent, O., Laurent, G., Gamber, P., Solary, E., Dimanche-Boitrel, M.T. (2004): Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. *Cancer Research* 64, 3593-3598

Landry, D.W., Oliver, J.A. (2001): The pathogenesis of vasodilatory shock. *N. Engl. J. Med.* 345, 588-595

Leibovici, L., Greenshtain, S., Cohen, O., Mor, F., Wysenbeek, A.J. (1991): Bacteremia in febrile patients: a clinical model for diagnosis. *Arch. Intern. Med.* 151, 1801-1806

Linscheid, P., Seboek, D., Schaer, D.J., Zulewski, H., Keller, U., Müller, B. (2004): Expression and secretion of procalcitonin and calcitonin gene-related peptide by adherent monocytes and by macrophage-activated adipocytes. *Crit. Care Med.* 32, 1715-1721

Luzzani A., Polati E., Dorizzi R., Rungtatscher A., Pavan R., Merlini A. (2003): Comparison of procalcitonin and C-reactive protein as markers of sepsis. *Crit. Care Med.* 31, 1737-1741

Martin, G.S., Mannino, D.M., Eaton, S., Moss, M. (2000): The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through. *N. Engl. J. Med.* 348, 1546-1554

Meisner, M., Tschaikowsky, K., Hutzler, A., Schick, C., Schüttler, J. (1998): Postoperative plasma concentrations of procalcitonin after different types of surgery. *Intensive Care Med.* 24,680-684

Meisner, M. (2000): Procalcitonin Ein neuer innovativer Infektionspararmeter Biochemische und klinische Aspekte. 3. überarbeitete und erweiterte Auflage Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York

Müller, B., Becker, K.I, Schächinger, H., Rickenbacher, P.R., Huber, P.R., Zimmerli, W., Ritz, R. (2000): Calcitonin precursors are reliable marker of sepsis in a medical intensive care unit. *Crit. Care Med.* 28, 977-983

Muller-Kobold, A.C., Tulleken, J.E., Zijlstra, J.G., Sluiter, W., Hermans, J., Kallenberg, C.G.M., Cohen, Tervaert, J.W. (2000): Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med.* 26, 883-892

Nobre, V., Harbath, S., Graf, J.-D., Rohner, P., Pugin, J. (2008): Use of Procalcitonin to Shorten Antibiotic Treatment Duration in Septic Patients. *Critical Care Medicine* 177, 498-505

Novotny, A., Emmanuel, K., Matevossian, E., Kriner, M., Ulm, K., Bartels H., Holzmann, B., Weighardt, H., Siewert, J.R. (2007): Use of procalcitonin for early prediction of lethal outcome of postoperative sepsis. *Am. J. Surg.* 194, 35-39

Huesner, N., Knebel, C., Kriner, M., Ulm, K., Bartels, H., Siewert, J.R., Holzmann, B. (2009): Procalcitonin ratio indicates sucessful surgical treatment of abdominal sepsis, *Surgery* 145, 20-26

Oberhofer, D., Rumenjak, V., Lazić, J., Vucić, N. (2006): Inflammatory indicators in patients after surgery of the large intestine, *Acta. Med. Croatica.* 60, 429-433

Oberhoffer, M., Karzai, W., Meier-Hellmann, A., Bögel, D., Fassbinder, J., Reinhart, K. (1999): Sensitivity and specificity of various markers of inflammation for the prediction of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in patients with sepsis. *Crit. Care Med.* 27, 1814-1818

Quinter, L.L., Zenk, T.S., Sandhoff, K. (1989): The urine from patients with peritonitis as a rich source for purifying human acid Sphingomyelinase and other lysosomal enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1003, 121-124

Quintern, L.E., Weitz, G., Nehrkorn, H., Tager, J.M., Schram, A.W., Sandhoff, K. (1987): Acid Sphingomyelinase from human urine: purification and characterization. *Biochim Biophys Acta* 922, 323-336

Qureshi, S.S., Lewis, S.M., Gant, V.A., Treacher, D., Davis, B.H., Brown, K.A. (2001): Increased distribution and expression of CD64 on blood polymorphonuclear cells from patients with the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Clin. Exp. Immunol.* 125, 258-265

Reinhart, K., Brunkhorst, F.M., Bone, H.-G., Gerlach, H., Gründling, M., Kreymann, G., Kujath, G., Marggraf, G., Mayer, K., Meier-Hellmann, A., Peckelsen, C., Putensen, C., Quintel, M., Ragaller, M., Rossaint, R., Stüber, F., Weiler, N., Welte, T., Werdan, K. (2005): Diagnose und Therapie der Sepsis. S-2 Leitlinien der Deutschen Sepsis Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI) Members of the American college of chest physicians (ACCP)/society of critical care medicine (SCCM) consensus conference committee (1992): Definitions of sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care Med.* 20, 864-874

Reith, H.B., Mittelkötter, U., Debus, E.S. Küssner, C., Thiede, A. (1998): Procalcitonin in Early Detection of postoperative Complications. *Digestive Surgery* 15, 260-265

Rey, C., Los Acros, M., Concha, A., Medina, A., Prieto, S., Martinez, P. Prieto, B. (2007): Procalcitonin and C-reactive protein as markers of systemic inflammatory response syndrome severity in critically ill children. *Intensive Care Med.* 33, 477-484

Riedemann, N.C., Guo, R.F., Ward, P.A. (2003): Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nature Med.* 9, 517-524

Ruggiero, M.S. (2008): Effects of Vasopressin in Septic Shock. *AACN Advanced Critical Care* 19, 281-287

Salgado, D.R., Rocco, J.R., Rosso Verdeal, J.C. (2008): Adrenal function in different subgroups of septic shock patients. *Acta. Anaesthesiol. Scand.* 52, 36-44

Schenck, M., Carpinteiro, A., Grassme, H., Lang, F., Gulbins, E. (2007): Ceramide. Physiological and pathophysiological aspects *Archives of Biochemistry and Biophysics* 462, 171-175

Schissel, S.L., Kessler, G.A., Schuchman, E.H., Williams, K.J., Tabas, I. (1998): The cellular trafficking and zinc dependence of secretory and lysosomal sphingomyelinase, two products of the acid sphingomyelinase gene. *J. Biol. Chem.* 29, 18250-18259

Schütze, S., Potthoff, K., Machleidt, T., Berkovic, D., Wiegmann, K., Rönke, M. (1992): TNF activates NF- κ B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "Acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell Press* 71, 765-776

Selzner, M., Bielawska, A., Morse, M.A., Rüdiger, H.A., Sindram, D., Hannun, Y.A., Clavien, P.-A. (2001): Induction of Apoptotic Cell Death and Prevention of Tumor Growth by Ceramide Analogues in Metastatic Human Colon Cancer, *Cancer Research* 61, 1233-1240

Silvestre, J., Pova, P., Coehlo, L., Almeida, E., Moreira, P., Fernandes, A., Mahla, R., Salbino, H. (2008): Is C-reactive protein a good prognostic marker in septic patients. *Intensive Care Med.* 35, 909-913

Smith, E.L., Schuchmann, E.H. (2008): The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases, *FASEB J.* 22, 3419-3431

Sudhir, M., Schissel, S.L., Yellin, M.J., Beatini, N., Mintzer, R., Williams, K.J., Tabas, I. (1998): Human vascular endothelial cell are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase, *The Journal of Biology Chemistry* 7, 4081-4088

Tabas, I. (1999): Secretory sphingomyelinase. *Chem. Phys. Lipids* 102, 123-30

Teichgräber, V., Ulrich, M., Endlich, N., Riethmüller, J., Wilker, B., De Oliveeira-Munding, C.C., van Heeckeren, A.M., Barr, M.L., von Kürthy, G., Schmid, K.W., Weller, M., Tümmler, B., Lang, F., Grassme, H., Döring, G., Gulbins, E. (2008): Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nature medicine* 14, 382-391

Tellado, J.M., Christou, N.V. (1991): Critically ill anergic patients demonstrate polymorphonuclear neutrophil activation in the intravascular compartment with decreased cell delivery to inflammatory foci. *J. Leukoc. Biol.* 50, 547-55

ten Cate, H., Schoenmakers, S.H., Franco, R., Timmerman, J.J., Groot, A.P., Spek, C.A., Reitsma, P.H. (2001): Microvascular coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *Crit. Care Med.* 29, 95-98

Vincent, J.L., Bihari, D.J., Suter, P.M., Bruining, H.A., White, J., Nicolas-Chanoine, M.H., Wolff, M., Spencer, R.C., Hemmer, M. (1995): The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *Jama* 274, 639-644

Werdan, K., Schuster, H.P., Müller-Werdan, U. (2005): Sepsis und MODS. 4. Vollständig überarbeitet Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg

Wong, M.L., Xie, B., Beatini, N., Phu, P., Marathe, S., Johns, A., Gold, P.W., Hirsch, E., Williams, K.J., Licinio, J., Tabas, I. (2000): Acute systemic inflammation up-regulates secretory sphingomyelinase in vivo: a possible link between inflammatory cytokines and atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 8681-8686

Yusu, A.H., Obeid, H., Obeid, L.M. (2008): Principial of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Molecular cell biology* 9, 139-150

7. Danksagung

Sehr herzlich danken möchte ich Prof. Dr. rer. nat. Stefan Schütze und Prof. Dr. med. Norbert Weiler für die Überlassung des Themas und hervorragende Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit – insbesondere für die persönliche Zusammenarbeit in der Immunologie.

Meinen ganz besonderen Dank verdienen Dr. med. Gunnar Elke und Dr. rer. nat. Supandi Winoto-Morbach für ihre exzellente Betreuung und grenzenlose Geduld.

Nicht zuletzt danke ich den Patienten und freiwilligen Probanden, die sich für diese Studie zur Verfügung gestellt haben, dem Intensivmedizinpersonal des Instituts für Anästhesie und alle Laborant(inn)en des Instituts der Immunologie besonders dem Team des PCT-Labors.

Lebenslauf

Geburtsdatum	21.05.1981
Geburtsort	Husum, Deutschland
Eltern	Dr. med. Rolf-Friedrich Reinicke Ursula Reinicke

Schulische Ausbildung

1987	Einschulung in die Grundschule Karby
1991	Einschulung in die Orientierungsstufe der Klaus-Harms-Schule in Kappeln
2000	Abitur

Weiterführende Ausbildungen

Oktober 2000 - Oktober 2003	Krankenschwesterausbildung beim DRK am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
Oktober 2003	Krankenschwesterexam
April 2004 - Oktober 2006	Immatrikulation für Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Gießen
April 2006	Physikum
Oktober 2006	Immatrikulation an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel
Mai 2007	Doktorandin des Instituts für Immunologie sowie der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel